

Université de Montréal

Localisation de l'ARNm STAT3 aux protrusions des cellules du carcinome  
hépatocellulaire associées à un phénotype métastatique

par Lynda Dekakra-Bellili

Université de Montréal, Département de Biochimie et médecine moléculaire  
Faculté de Médecine

Mémoire présentée  
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.  
en Biochimie et médecine moléculaire  
option Génétique

Août 2019

© Lynda Dekakra-Bellili, 2019

## Résumé

La polarisation des cellules est essentielle à la division cellulaire asymétrique, la migration cellulaire, la fonction neuronale et le développement embryonnaire. Elle peut se faire par le mécanisme de localisation des ARNm dans des compartiments cellulaires spécifiques. Bien que le mécanisme de localisation des ARNm soit assez bien défini dans tous les types cellulaires, son implication dans le développement du cancer n'a pas été caractérisée. Une étude de séquençage direct de l'ARN, réalisée sur des cellules métastatiques (HCCLM3) du carcinome hépatocellulaire (CHC) a déterminé qu'au niveau de leurs protrusions, certains ARNm y sont enrichis, alors qu'aux protrusions des cellules CHC non-métastatiques SMMC7721, ces ARNm n'y sont pas enrichis. L'ARNm qui encode pour le facteur de transcription STAT3 figure parmi ceux identifiés comme étant enrichis. La technique du *smiFISH* a été utilisée pour valider l'enrichissement de l'ARNm STAT3 au niveau des protrusions des cellules CHC associées à un phénotype métastatique. Les résultats obtenus démontrent que l'essai de déplétion de sérum permet d'induire la migration des cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H, qui forment des protrusions de type lamellipode. En parallèle, l'expression de l' $\alpha$ -actinine-GFP a permis de visualiser les régions protrusives et de les délimiter. Les expériences de *smiFISH* et les mesures d'expression relative par RT-qPCR ont révélé que les cellules métastatiques HCCLM3 et MHCC97H expriment peu d'ARNm STAT3, comparativement aux cellules non-métastatiques SMMC7721. De plus, les quantifications absolues de l'enrichissement démontrent que dans toutes les lignées CHC, les molécules d'ARNm STAT3 uniques localisent majoritairement au niveau des corps cellulaires, et très peu dans les protrusions. Le ratio du nombre de molécules d'ARNm STAT3 uniques localisées dans les protrusions sur le nombre de molécules uniques localisées dans les corps cellulaires est nettement plus petit pour les cellules HCCLM3 et MHCC97H que pour les cellules SMMC7721. La densité de l'ARNm STAT3 / unité de surface dans les protrusions des cellules HCCLM3 et MHCC97H est inférieure à celle des cellules SMMC7721. Ensemble, ces résultats confirment qu'il n'y a pas d'enrichissement de l'ARNm STAT3 aux protrusions des cellules CHC associées à un phénotype métastatique.

**Mots-clés :** *smiFISH*, microscopie, migration cellulaire, cancer, métastase, CHC

## Abstract

Subcellular mRNA localization regulates cell polarization. Asymmetric distribution of transcripts is important in cell division, cell migration, neuronal function and embryonic development. In all cell types, the mechanisms of mRNA localization are well defined, but their involvement in cancer development is still unknown. A recent study has identified protrusion-localized STAT3 mRNA in metastatic hepatocarcinoma cells (HCCLM3). In comparison, the STAT3 mRNA was not found to be enriched in the non-metastatic cells (SMMC7721) protrusions. The enrichment of the STAT3 mRNA at the protrusions of HCC cells associated with a metastatic phenotype was studied by *smiFISH*. Our results showed that the serum starvation assay induced lamellipodia-based migration in SMMC7721, HCCLM3 and MHCC97H cells. Also, expression of GFP- $\alpha$ -actinin allowed to mark the protrusive regions of migrating HCC cells. The *smiFISH* results and RT-qPCR quantification revealed that the metastatic cells (HCCLM3 and MHCC97H) express lower levels of STAT3 mRNA compared to the non-metastatic cells (SMMC7721). Absolute quantification of localization and enrichment revealed that STAT3 mRNA mainly localizes in the cell bodies of all HCC cell lines. The ratio of the number of single molecules of STAT3 mRNA localized in the protrusions on the number of single molecules localized in the cell bodies is smaller for the metastatic cells than the non-metastatic cells. In the metastatic cells protrusions, the density of STAT3 mRNA / unit of surface was found to be lower than the non-metastatic cells. Altogether, these results confirm that there is no enrichment of STAT3 mRNA at the protrusions of metastatic HCC cells.

**Keywords :** *smiFISH* , microscopy, cell migration, cancer, metastasis, HCC

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract .....	ii
Liste des tableaux .....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations .....	viii
Remerciements.....	xi
Introduction .....	1
1. Généralités.....	1
2. Localisation de l'ARNm .....	1
3.1 Avantages.....	1
4 Mécanismes .....	2
4.1 Éléments de localisation .....	2
4.1.1 Transport .....	3
4.1.2 Ancrage .....	4
4.1.3 Traduction .....	4
5 Importance du mécanisme de localisation de l'ARNm .....	5
5.1 Développement embryonnaire.....	5
5.1.1 <i>Drosophila melanogaster</i> .....	5
5.1.2 <i>Xenopus laevis</i> .....	6
5.2 Division cellulaire.....	6
5.3 Migration cellulaire .....	7
5.3.1 Localisation des ARNm des protéines associées à l'actine .....	7
6 Régulation de la migration cellulaire.....	8
6.1 Le <i>lamellipodium</i> .....	8
6.1.1 Extension .....	8
6.1.2 Adhésion.....	9

6.1.3	Rétraction .....	12
6.2	Le <i>filopodium</i> .....	12
6.3	Le <i>bleb</i> .....	13
6.4	<i>Invadopodia</i> .....	13
7	Essais de migration et d'invasion <i>in vitro</i> .....	14
7.1	Surfaces d'adhésion .....	14
7.2	Essai de déplétion de sérum .....	14
7.3	Essai de cicatrisation .....	15
7.4	Essai de la chambre modifiée de Boyden .....	15
8	ARNm enrichis au niveau des protrusions cellulaires .....	16
9	Transcrits enrichis aux protrusions des cellules du carcinome hépatocellulaire .....	18
9.1	STAT3 .....	21
9.1.1	Activation de STAT3 .....	21
9.2	Mécanismes d'invasion et de migration cellulaires impliquant STAT3 .....	22
9.3	L'expression de STAT3 dans les cancers métastatiques .....	23
9.4	STAT3 dans le carcinome hépatocellulaire .....	23
10	Méthodes d'études du trafic de l'ARNm .....	24
10.1	CeFra-seq .....	24
10.2	Imagerie par fluorescence .....	24
10.2.1	Hybridation in situ en fluorescence de molécules uniques ( <i>smiFISH</i> ) .....	25
10.2.2	MERFISH .....	26
	Problématique et Hypothèse .....	27
	Objectifs .....	28
	Matériel et Méthodes .....	29
	Résultats .....	41
	Discussion .....	58
	Conclusion .....	66

**Bibliographie.....67**

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b>	Données d'ARN-Seq pour les ARNm STAT3 et JAK1.....	<b>19</b>
<b>Tableau II.</b>	Amorces utilisées en RT-qPCR.....	<b>33</b>
<b>Tableau III.</b>	Séquences des sondes primaires et le FLAP.....	<b>36</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Localisation d'ARNm dans différents organismes. ....	8
<b>Figure 2.</b> Caractéristiques moléculaires de la protrusion durant la migration cellulaire. ....	10
<b>Figure 3.</b> Ancrage du cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire .....	11
<b>Figure 4.</b> Localisation relative des ARNm STAT3 et JAK1 dans les protrusions des lignées CHC.....	20
<b>Figure 5.</b> Voies d'activation de STAT3 . ....	22
<b>Figure 6.</b> Design expérimental du <i>smiFISH</i> .....	26
<b>Figure 7.</b> Différents essais d'induction de la migration cellulaire des lignées CHC sur lamelle de verre.....	43
<b>Figure 8.</b> Mesures des surfaces des protrusions et des corps cellulaires formés par les lignées CHC étalées sur lamelle de verre. ....	46
<b>Figure 9.</b> Détection des ARNm STAT3 et JAK1 par <i>smiFISH</i> dans les lignées CHC.....	49
<b>Figure 10.</b> Validation de la spécificité des sondes <i>smiFISH</i> ciblant l'ARNm STAT3 .....	52
<b>Figure 11.</b> Localisation des ARNm STAT3 et JAK1 aux protrusions des lignées CHC .....	56
<b>Figure 12.</b> Évaluation de l'enrichissement de l'ARNm STAT3 aux protrusions des cellules CHC associées à un phénotype métastatique .....	57



## Liste des abréviations

ARN	acide ribonucléique
Arp2/3	protéines reliées à l'actine 2/3
3'-UTR	région 3' non traduite
5'-UTR	région 5' non traduite
RBP	protéines liant l'ARN
RNP	ribonucléoprotéine
Ash1	synthèse asymétrique de HO
Myo4p	myosine 4
ZBP1	protéine de liaison du zipcode
EF1 $\alpha$	facteur d'élongation 1 alpha
Src	sarcome de Rous
TGF $\alpha$	facteur de croissance transformant alpha
HO	Homothallic switching
She2	Swi5p-dépendante de l'expression de HO
Puf6	domaine d'homologie PUmilio
Khd1	protéine domaine KH
Loc1	localisation de l'ARNm
Rac	Homologue de Ras
WASP	protéine du syndrome Wiskott-Aldrich
ADN	Acide désoxyribonucléique
Rab13	protéine reliée à Ras 13
Cy3	cyanine 3
Cy5	cyanine 5
RhoA	Homologue de Ras A
p53	protéine tumorale 53
IL-6	interleukine 6
IL-22	interleukine 22
mDia	<i>mammalian diaphanous</i> reliée à la formine

---

gp130	glycoprotéine 130
<i>smiFISH</i>	hybridation <i>in situ</i> en fluorescence ( <i>single molecule inexpensive FISH</i> )
CeFra-Seq	fractionnement subcellulaire couplé au séquençage de l'ARN

---

Merci à mes parents pour leur soutien

Merci à mes soeurs, Imène et Fouzia, pour leurs encouragements

Merci à ma nièce Sofia et mon neveu Adam pour la joie qu'ils apportent

Merci à Imane et à Walid pour leur appui

*À vous tous , je dédie ce mémoire.*

*« Dis : que vous en semble ? Si votre eau était absorbée au plus profond de la Terre, qui donc vous apporterait de l'eau de source » S67:30*

## **Remerciements**

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche , Dr Pascal Chartrand, de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son équipe. Dans son laboratoire, j'ai développé des compétences en biologie moléculaire, notamment en culture cellulaire, en analyse et imagerie en fluorescence. Je le remercie pour sa patience, son encadrement et le partage de ses connaissances qui ont alimenté ma réflexion scientifique. Je remercie Dre Emmanuelle Querido pour sa disponibilité, son encadrement et ses critiques scientifiques constructives qui m'ont permis d'avancer dans mon projet de recherche. Je remercie mes collègues de laboratoire pour leur aide, leur soutien moral et pour le partage de leurs connaissances et leur expérience. Je remercie le laboratoire du Dr Gerardo Ferbeyre de m'avoir fourni un échantillon de plasmide lentiviral pLKO shRNA STAT3 qui m'a servi pour la réalisation de mes expériences. Je remercie Dr Luc DesGroseillers, mon encadreur externe. Je remercie les membres du jury, Dr Daniel Zenklusen et Dr Jean-Claude Labbé, d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

# **Introduction**

## **1. Généralités**

Dans l'organisme, les cellules accomplissent des fonctions variées dont les caractéristiques moléculaires sont de plus en plus décryptées grâce à l'étude des profils de localisation du transcriptome. Les molécules d'ARN codantes pour des protéines et non-codantes constituent le transcriptome (Lowe, Shirley, Bleackley, Dolan, & Shafee, 2017). Dans la régulation de certains processus biologiques, les ARNs assurent une fonction qui dépend de leur localisation cellulaire. C'est le cas des ARNs non codants qui peuvent être localisés soit dans le noyau, où ils modulent l'expression des gènes, soit dans le cytoplasme, où ils agissent, entre autres, en tant que molécules d'échafaudage (P. Wang et al., 2014).

Les ARNs codants ou ARNs messagers (ARNm) peuvent également être localisés. Leur distribution asymétrique permet aux cellules d'établir une polarisation nécessaire à la division et la migration cellulaires, à la fonction neuronale et au développement embryonnaire (Medioni, Mowry, & Besse, 2012). L'adressage des ARNm à des compartiments cellulaires bien définis permet une régulation raffinée de la synthèse des protéines en raison de la restriction de l'expression des transcrits dans le temps et l'espace (Pizzinga et al., 2019). Les aberrations qui affectent les mécanismes de localisation des molécules d'ARN contribuent au développement de myopathies, de maladies neurodégénératives et de cancers (Hochberg-Laufer, Schwed-Gross, Neugebauer, & Shav-Tal, 2019; Nussbacher, Tabet, Yeo, & Lagier-Tourenne, 2019).

## **2. Localisation de l'ARNm**

### **2.1 Avantages**

La localisation de l'ARNm à la place d'une protéine présente pour la cellule de nombreux avantages. D'abord, le mécanisme de localisation est moins coûteux en énergie et il est plus efficace parce qu'à partir d'une même molécule d'ARNm, plusieurs copies d'une

protéine peuvent être générées (Lécuyer et al., 2007). Par le biais de ce mécanisme, la cellule peut concentrer une protéine d'intérêt dans la région où elle doit être active (Martin & Ephrussi, 2009). Ensuite, un transcrit localisé et traduit localement permet à la cellule d'établir des réponses rapides aux stimulus externes. Il a été démontré que les ARNm de la  $\beta$ -actine et de certains de ses facteurs de polymérisation sont enrichis au front de migration, ce qui permet un remaniement rapide du cytosquelette (Medioni et al., 2012). Plus encore, la localisation de certains transcrits facilite l'assemblage des protéines en complexes multiprotéiques dans des régions sous-cellulaires bien spécifiques grâce à une co-translation des différentes sous-unités de ces complexes. C'est ce qui a été démontré pour le facteur de nucléation de l'actine Arp2/3 ayant sept sous-unités et dont les ARNm localisent tous au front de migration des fibroblastes primaires humains (Mingle et al., 2005). Finalement, les protéines synthétisées à partir d'ARNm localisés peuvent avoir des propriétés distinctes de celles des copies existantes et ce, à cause de modifications post-translationnelles ou de différents repliements qui peuvent avoir lieu (Lin & Holt, 2007).

### **3 Mécanismes**

#### **3.1 Éléments de localisation**

Un ARNm destiné à être localisé doit contenir dans sa séquence un «code postal» (ou élément de localisation) qui rend possible son envoi à une région spécifique du cytoplasme. Généralement, cet élément de séquence *cis*-régulateur appelé zipcode se trouve dans la région 3' non traduite (3'-UTR) du transcrit, et il peut contenir jusqu'à une centaine de nucléotides. Bien que la localisation de l'ARNm soit un mécanisme qui est conservé entre les espèces, il n'existe pas de séquence consensus zipcode (Bullock, Ringel, Ish-Horowicz, & Lukavsky, 2010; Chao et al., 2010; Dienstbier, Boehl, Li, & Bullock, 2009). L'identification des éléments de localisation se fait en utilisant un ARN rapporteur hétérologue ( GFP, LacZ, etc. ) auquel sont fusionnées des séquences soupçonnées d'être des zipcodes afin d'observer si celles-ci lui confèrent une nouvelle localisation ou non (Buxbaum, Haimovich, & Singer, 2015). En utilisant cette approche, plusieurs zipcodes ont été caractérisés sur la base de leurs séquences primaires, de leurs structures secondaires et même tertiaires (Chin & Lecuyer, 2017).

Chez certains ARNm, le zipcode peut se retrouver dans les régions codantes ou régions 5' non traduites (5'-UTR). Chez d'autres, la localisation ne dépend pas seulement de la présence d'un zipcode en 3'-UTR, mais aussi d'évènements de maturation qui surviennent dans le noyau.

C'est le cas de l'ARNm *oskar*, un déterminant postérieur de la drosophile, dont l'épissage du premier intron doit avoir lieu pour que sa localisation soit possible (Jambor, Mueller, Bullock, & Ephrussi, 2014). L'épissage de cet intron crée une tige-boucle d'ARN qui permet aux nucléotides complémentaires des exons 1 et 2 d'être juxtaposés et former un signal de ciblage postérieur (Macdonald & Struhl, 1988).

### 3.1.1 Transport

Les éléments de localisation en *cis* sont reconnus par des régulateurs agissant en *trans*. Il s'agit généralement de protéines liant l'ARN (*RNA-Binding proteins* ou *RBP*s) avec lequel elles forment des complexes ribonucléoprotéiques (Xiao et al., 2007). Ces protéines assurent à la fois le trafic, la stabilité et la répression spatiale du transcrit à localiser.

Une fois le complexe ribonucléoprotéique (RNP) assemblé, il est activement transporté le long du cytosquelette à l'aide de protéines motrices. C'est le mécanisme qui prédomine le plus, mais des exemples de localisation d'ARNm par diffusion et capture ou par protection sélective contre la dégradation ont été rapportés (Marchand, Gaspar, & Ephrussi, 2012). Dans certains types cellulaires qui utilisent la localisation de l'ARNm, le cytosquelette adopte une polarité bien définie favorisant un transport directionnel comme dans les neurones où le centrosome et l'extrémité (-) des microtubules se rapprochent du corps cellulaire alors que leur extrémité (+) s'étend vers les axones et les dendrites (Glock, Heumuller, & Schuman, 2017). La protéine motrice Kinésine procède alors à un transport antérograde vers les parties distales de la cellule (de l'extrémité - vers l'extrémité +), tandis que la Dynéine effectue un transport rétrograde vers le corps cellulaire (de l'extrémité + vers l'extrémité -) (Xing & Bassell, 2013). Par contre, dans les systèmes où il n'y a pas de polarité définie, les mécanismes de transport directionnel restent à investiguer.

Des études ont démontré que les protéines de liaison à l'ARN (RBPs) peuvent être impliquées dans le transport actif de certains ARNm. Par exemple, chez la *Drosophile*, le transport actif de l'ARNm encodant pour la protéine de liaison à l'ADN K10 le long des microtubules nécessite la présence de la protéine cargo Bicaudale D (BicD) et de la protéine de liaison à l'ARN Egalitarian (Egl), parcequ'elles agissent de concert pour lier ce transcrit aux moteurs Dynéine-Dynactine. Dans ce cas, Egl assure un rôle de protéine adaptatrice et coopère au transport piloté par la Dynéine (Sladewski et al., 2018).

Le zipcode peut également influencer l'efficacité et la vitesse à laquelle se fait la localisation. (Kislauskis, Zhu, & Singer, 1994). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il a été démontré que la présence de plusieurs éléments de localisation au niveau de l'ARNm Ash1 favorise le recrutement d'un grand nombre de molécules de la protéine motrice Myo4p, ce qui rend son transport le long des filaments d'actine plus efficace (S. Chung & Takizawa, 2010).

### **3.1.2 Ancrage**

Le transcrit localisé doit être ancré afin que sa distribution asymétrique soit conservée. Par exemple, les cellules qui localisent leurs ARNm par le biais du réseau de microtubules assurent leur ancrage via le cytosquelette d'actine, comme dans les fibroblastes où l'ARNm de la  $\beta$ -actine est lié aux filaments d'actine par la machinerie de traduction (Blower, 2013; Gagnon & Mowry, 2011). Un autre mécanisme d'ancrage de l'ARNm consiste à modifier l'activité des protéines motrices en protéines statiques d'ancrage (Delanoue, Herpers, Soetaert, Davis, & Rabouille, 2007).

### **3.1.3 Traduction**

Une fois que l'ARNm est localisé et ancré, il est traduit. L'exemple le mieux connu est celui de l'ARNm  $\beta$ -actine. C'est la protéine ZBP1 (*Zipcode Binding Protein 1*) qui est à la fois responsable de la localisation de cet ARNm au front de migration et de la régulation de sa traduction. Dans le noyau, ZBP1 s'associe au transcrit de la  $\beta$ -actine et y demeure liée durant son export vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, ZBP1 maintient l'inhibition de la



traduction de l'ARNm  $\beta$ -actine tout au long de son transport vers son site d'action. L'ancrage de l'ARNm  $\beta$ -actine sur les filaments d'actine se fait par le facteur d'élongation EF1 $\alpha$ . Sa traduction aux protrusions cellulaires est connue pour être régulée par la tyrosine kinase Src. La protéine Src phosphoryle ZBP1, provoque sa dissociation de l'ARNm  $\beta$ -actine et initie par le fait même sa traduction (Shestakova, Singer, & Condeelis, 2001).

## **4 Importance du mécanisme de localisation de l'ARNm**

Dans la littérature, le mécanisme de localisation est bien décrit, particulièrement chez les organismes modèles.

### **4.1 Développement embryonnaire**

#### **4.1.1 *Drosophila melanogaster***

Chez la Drosophile, la localisation des ARNm maternels joue un rôle décisif dans la spécification des deux axes embryonnaires de l'ovocyte (Cody, Iampietro, & Lécuyer, 2013) (**Figure 1**). La mère synthétise d'abord les facteurs maternels dans ses cellules nourricières, puis elle les transfère à l'ovocyte via les ponts cytoplasmiques et le réseau de microtubules qui les relie. Au début de l'ovogénèse, l'extrémité (-) des microtubules est orientée vers le pôle postérieur de l'ovocyte pour faciliter l'adressage de l'ARNm maternel *gurken* à cette région. L'ARNm *gurken* code pour le facteur TGF $\alpha$  qui, lorsqu'il est exprimé, agit sur les cellules folliculaires à proximité et provoque leur différenciation dans le but d'initier la formation des structures postérieures. Ensuite, l'ovocyte se repolarise de manière à orienter l'extrémité (-) des microtubules vers le pôle antérieur où la protéine motrice Dynéine localise l'ARNm *bicoid*. Grâce à son mouvement antérograde le long des microtubules, la Kinésine, quant à elle, localise l'ARNm *oskar* au pôle postérieur (Lasko, 2012). L'établissement de l'axe antéro-postérieur est complété suite à l'expression de l'ARNm *oskar* qui favorise l'accumulation d'un autre déterminant postérieur, à savoir l'ARNm *nanos* (Jambor et al., 2014). L'ARNm *gurken* est subséquentement localisé au pôle dorsal où il y joue un rôle dans l'établissement de l'axe

dorso-ventral. Chez la *Drosophile*, la polarisation dorso-ventrale se fait selon une série d'étapes qui implique un gradient d'activité de protéines telles que Toll, Dpp et Dorsal.

#### 4.1.2 *Xenopus laevis*

Chez le *Xenopus*, la mise en place de l'axe pôle animal-pôle végétatif de l'ovocyte dépend du mécanisme de localisation de l'ARNm (**Figure 1**). En effet, parmi la multitude d'ARNm maternels impliqués, Vg1 et VegT sont concentrés spécifiquement au niveau du pôle végétatif (Deshler, Highett, Abramson, & Schnapp, 1998; Kloc et al., 2005). L'ARNm Vg1 s'accumule dans l'hémisphère végétatif avant d'être transporté le long des microtubules jusqu'au cortex végétatif. Ce transcrit code pour un facteur de croissance de la famille TGF- $\beta$ , et lorsqu'il est exprimé, il induit la formation du mésoderme. Quant au transcrit VegT, il code pour un facteur de transcription et il est impliqué à la fois dans la formation du mésoderme et de l'endoderme (Heasman, Wessely, Langland, Craig, & Kessler, 2001).

## 4.2 Division cellulaire

La localisation de l'ARNm permet d'établir une asymétrie lors de la division cellulaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (**Figure 1**). En fin d'anaphase, le transcrit Ash1 est localisé dans la cellule fille, engendrée par bourgeonnement. Lorsqu'il est exprimé, Ash1 réprime la protéine HO qui est responsable de la commutation du type sexuel chez la levure (Long et al., 1997). Dans sa séquence codante, l'ARNm Ash1 comprend quatre éléments de localisation: E1, E2, E2B et E3. *In vivo*, l'élément E3 est suffisant pour un transport efficace, suggérant qu'il y a une redondance dans la fonction des éléments de localisation (Chartrand, Meng, Singer, & Long, 1999; Heym & Niessing, 2012; Niessing, Hüttelmaier, Zenklusen, Singer, & Burley, 2004). La protéine She2 reconnaît et lie l'ARNm Ash1, alors que la protéine She3 sert d'adaptateur à Myo4, la protéine motrice qui transporte le transcrit Ash1 le long des filaments d'actine vers le bourgeon. D'autres protéines de liaison de l'ARN, comme Puf6, Khdl et Loc1, sont aussi nécessaires pour la régulation de la traduction de l'ARNm Ash1 (Chin & Lecuyer, 2017).

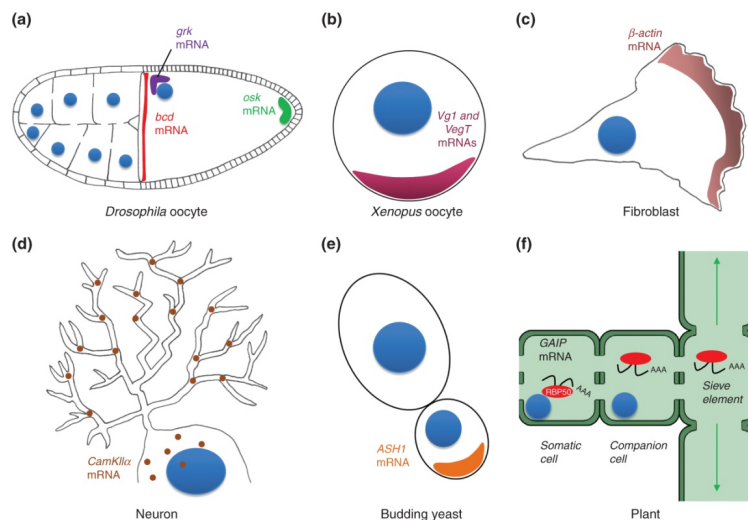
### 4.3 Migration cellulaire

La migration cellulaire joue un rôle-clé dans des processus cellulaires à la fois physiologiques et pathologiques, comme l'immunité, l'inflammation, la cicatrisation et la progression du cancer. Pour migrer, les cellules adoptent une morphologie polarisée qui permet une distinction claire entre le front et l'arrière de la cellule. D'ailleurs, certains ARNm et protéines sont enrichis au front de migration (Clark & Vignjevic, 2015).

Durant la migration naît une force motrice due à un remodelage rapide du cytosquelette qui se caractérise par des événements de polymérisation et dépolymérisation de l'actine en filaments. La localisation de l'ARNm est un des mécanismes de régulation de la migration cellulaire. Il génère un enrichissement de l'ARNm de la  $\beta$ -actine au niveau des protrusions où il est traduit. Mais, selon des études réalisées *in vitro* sur des surfaces, cette localisation requiert une stimulation des cellules avec du sérum ou bien avec un facteur de croissance (Mingle et al., 2005).

#### 4.3.1 Localisation des ARNm des protéines associées à l'actine

Des études démontrent que les ARNm de deux protéines associées à l'actine localisent à la protrusion dès l'initiation de la migration. D'une part, le complexe Arp2/3 est le facteur de nucléation qui initie la polymérisation de l'actine et son assemblage en filaments (F-actine). La répression de l'expression d'un des ARNm des sept sous-unités du complexe Arp2/3 empêche sa localisation au front de migration et entraîne des changements dans la vitesse et la direction de la migration (Mingle et al., 2005). De plus, la protéine ZBP1 est suspectée d'être impliquée dans la localisation de Arp2/3, puisqu'il a été démontré qu'elle peut lier les ARNm de ses sous-unités (Martin & Ephrussi, 2009). D'autre part, la cofiline 1 est le facteur de dépolymérisation de l'actine qui génère une réserve d'actine monomérique (*G-actine*). Son ARNm localise rapidement au front de migration des cellules du carcinome pulmonaire humain. Ce sont les protéines de liaison à l'ARN de la famille VICKZ telles que ZBP1 qui sont responsables de la localisation du transcrit de la cofiline 1 grâce à une interaction spécifique avec sa région 3'-UTR (Maizels et al., 2015).



**Figure 1. Localisation d'ARNm dans différents organismes.** a) Les ARNm des déterminants maternels *bicoid*, *oskar*, et *gurken* localisés aux régions antérieure, postérieure et antérodorsale chez l'ovoocyte de la Drosophile. b) Chez l'ovoocyte de *Xenopus*, les ARNm *Vg1* et *VegT* sont ciblés au pôle végétal où ils participent à la formation de l'endoderme et du mésoderme. c) Le fibroblaste en migration localise l'ARNm de la  $\beta$ -actine au front de migration, ce qui facilite l'assemblage de l'actine en filaments. d) Localisation de l'ARNm *CamKII $\alpha$*  aux dendrites des neurones. e) Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* en division, le transcrit *Ash1* est localisé dans la cellule fille engendrée par bourgeonnement où il régule la commutation du type sexuel. f) Chez *Cucurbita maxima*, les complexes ribonucléoprotéiques formés par la protéine RBP50 et les ARNm tels que GAIP effectuent un trafic intercellulaire à long distance dans le flux de phloème de la plante (Cody et al., 2013).

## 5 Régulation de la migration cellulaire

Les cellules migrent à l'aide de protrusions qui peuvent être de plusieurs types : le lamellipode, le filopode, le bleb et l'invadopode.

### 5.1 Le lamellipodium

#### 5.1.1 Extension

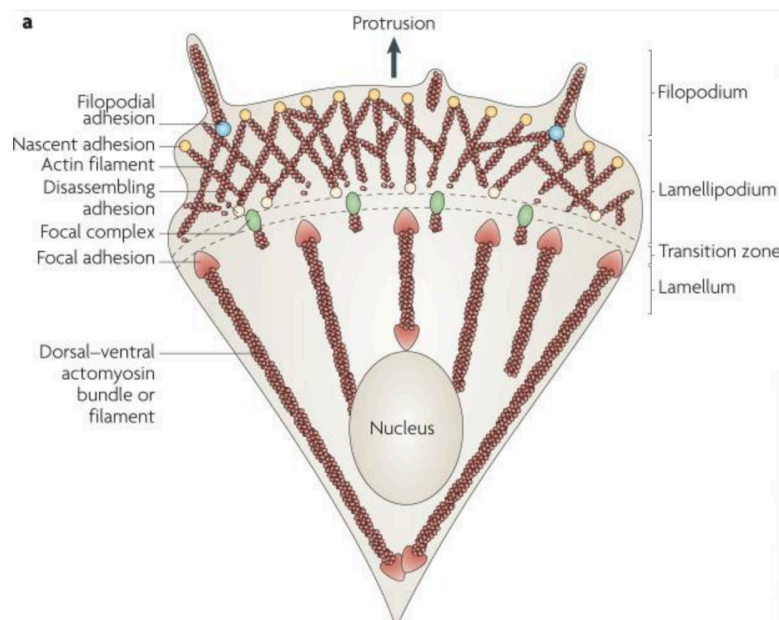
L'extension de la membrane de type lamellipode est fine, large et se distingue par l'assemblage de l'actine en un réseau de filaments ramifiés qui fait intervenir principalement le complexe Arp2/3 (**Figure 2**) (Parsons, Horwitz, & Schwartz, 2010). L'actine monomérique se

polymérise en filaments dont les extrémités barbées sont orientées vers la membrane plasmique. À la membrane, la petite GTPase Rac recrute le complexe WAVE de la famille WASP et l'active; ce dernier active à son tour Arp2/3. Ce complexe induit la nucléation de l'actine, mais seulement à partir de filaments préexistants (Krause & Gautreau, 2014; Vicente-Manzanares, Webb, & Horwitz, 2005). Les mécanismes menant à la formation du premier filament, qui sert d'amorce, ne sont pas encore bien caractérisés; mais des hypothèses suggèrent que l'ADF-cofiline pourrait y avoir un rôle. En effet, la cofiline induit une torsion au filament d'actine et provoque sa rupture. Donc, en intervenant au niveau du cortex d'actine présent à la périphérie de la cellule, la cofiline pourrait générer des filaments d'actine qui serviraient d'amorces à la ramification (Le Clainche & Carlier, 2008; Ridley, 2011). La protéine d'échafaudage cortactine, quant à elle, stabilise les embranchements de la F-actine, ce qui augmente la persistance du lamellipode (Bryce et al., 2005). De leur côté, les protéines de coiffe régulent l'architecture de l'actine filamenteuse en liant ses extrémités barbées afin d'arrêter leur élongation. Ainsi, les protéines de coiffe contribuent à la composition du réseau d'actine en filaments courts et fortement ramifiés afin de donner au lamellipode la rigidité nécessaire qui génère la force motrice (Edwards et al., 2014).

### 5.1.2 Adhésion

Une fois la formation du lamellipode initiée, son ancrage à la matrice extracellulaire est engagé (**Figures 2, 3**). Des points d'adhésion prennent naissance dans le lamellipode grâce à l'action coordonnée d'une variété de protéines, notamment les intégrines, la paxilline et l' $\alpha$ -actinine (Vicente-Manzanares, Choi, & Horwitz, 2009; Wolfenson, Lavelin, & Geiger, 2013). Lorsque le contact avec le ligand extracellulaire est établi, il y a activation des récepteurs intégrines et recrutement de protéines adaptatrices (Wehrle-Haller, 2012). À mesure que la migration progresse, la plupart des adhérences naissantes se désassemblent. Toutefois, certaines vont se consolider en des structures plus larges et allongées, appelées adhésions focales (AF). La maturation de ces complexes focaux a lieu entre le lamellipode et le *lamellae*, région qui se trouve derrière le lamellipode et où l'actine s'organise sous forme de faisceaux (Figure 2) (Tojkander, Gateva, & Lappalainen, 2012). C'est la myosine II non-musculaire

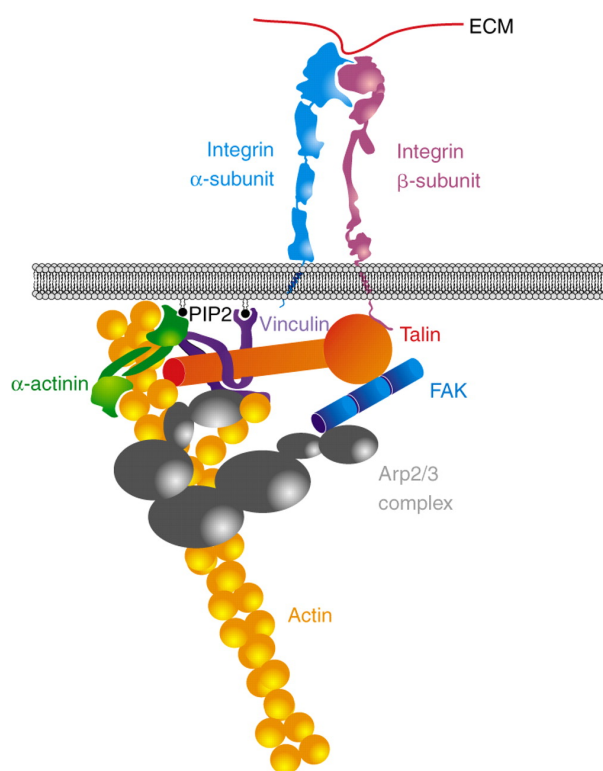
(NM) qui regroupe les filaments d'actine en faisceaux et qui, pour contrecarrer le mouvement vers l'avant, génère leur flux rétrograde grâce à son activité motrice (Parsons et al., 2010; Vicente-Manzanares, Ma, Adelstein, & Horwitz, 2009). Cela a un effet sur la maturation des adhésions. D'une part, le regroupement des filaments d'actine entraîne celui des protéines d'adhésion qui y sont associées. D'autre part, la contraction des moteurs myosines engendre une tension qui provoque des changements de conformation des protéines d'adhésion et favorise les interactions les unes avec les autres. Parmi les protéines impliquées, il y a la taline, la vinculine, l' $\alpha$ -actinine et la kinase d'adhérence focale (FAK) (**Figures 2, 3**) (De Pascalis & Etienne-Manneville, 2017). Ensemble, ces protéines attachent les faisceaux d'actine au substrat extracellulaire ; il en résulte une traction qui s'oppose au flux rétrograde et qui permet à la cellule d'aller de l'avant.



**Figure 2. Caractéristiques moléculaires de la protrusion durant la migration cellulaire:** Des adhérences naissantes se forment initialement dans le lamellipode et leur vitesse d'assemblage corrèle avec celle du mouvement de la protrusion. La maturation des adhérences en adhésions focales implique le regroupement de plusieurs protéines clés, suivi de l'ancrage des filaments d'actine à la matrice extracellulaire. Ces complexes focaux se forment derrière le lamellipode. La force de traction générée par les adhésions focales ainsi que celle provoquée par contraction de l'actomyosine permettent à la cellule d'aller de l'avant (Parsons et al., 2010).

### 5.1.2.1 $\alpha$ -actinine

L' $\alpha$ -actinine est une protéine appartenant à la superfamille des spectrines (**Figure 3**) (Fukumoto, Kurisu, Yamada, & Takenawa, 2015). Elle est l'une des protéines à s'accumuler en premier aux adhérences pour initier leur maturation. Elle procède à la réticulation des filaments parallèles d'actine et les lie spécifiquement aux intégrines, générant ainsi une tension qui promeut son recrutement et celui de la paxilline aux sites d'adhésion. La translocation de l' $\alpha$ -actinine des adhésions focales en expansion induit une force qui provoque leur réorientation durant la migration (Ye et al., 2014).



**Figure 3. Ancrage du cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire:** Les sous-unités transmembranaires  $\alpha$  et  $\beta$  des intégrines interagissent avec le substrat de la matrice extracellulaire. Dans le cytoplasme, elles lient directement la taline qui, à son tour, lie l'actine et la vinculine. L' $\alpha$ -actinine, facteur de réticulation de l'actine, lie la vinculine afin que toutes deux puissent être ancrées à la membrane. Leur activité est régulée par des interactions avec le phosphatidylinositol (4,5) -bisphosphate (PIP2). Enfin, la vinculine et la FAK lient le facteur de nucléation de l'actine Arp2/3 (Vicente-Manzanares, Choi, et al., 2009).

### 5.1.3 Rétraction

L'arrière de la cellule adhère au substrat, mais les sites d'adhésion formés doivent continuellement se désassembler afin de lui permettre de se détacher, de se rétracter, puis de se déplacer vers l'avant. Le processus de détachement se fait en dissociant les intégrines de leurs ligands et des protéines adaptatrices par phosphorylation ou déphosphorylation, entraînant ainsi un affaiblissement des sites d'ancrage (Cramer, 2013). Ces derniers peuvent aussi être brisés par clivage protéolytique. La cellule se détache, mais les intégrines restent liées au substrat, tandis que les autres protéines se déplacent avec le cytosquelette d'actine vers le corps cellulaire (Huttenlocher & Horwitz, 2011). Des études suggèrent que les intégrines liées au substrat forment des macroagrégats qui serviraient de signalisation chimiotactique à certains types de cellules. Il a été démontré que la force contractile engendrée par le cytosquelette actomyosine, si elle est plus grande que la force d'adhésion, pourrait favoriser le détachement de la cellule de la matrice extracellulaire (Kirfel, Rigort, Borm, & Herzog, 2004).

## 5.2 Le *filopodium*

L'initiation de la formation de la protrusion de type filopode, d'apparence fine et pointue, implique la petite GTPase Cdc42 et son partenaire d'interaction, le substrat p53 du récepteur à l'insuline (IRSp53). Étant sous le contrôle de l'effecteur Cdc42, la protéine IRSp53 déforme la membrane plasmique et lui donne des courbures (Disanza et al., 2013). C'est la protéine Dia2 de la famille des formines qui catalyse la polymérisation de l'actine en filaments parallèles (Ridley, 2006). Les protéines Ena/VASP semblent également participer à l'élongation de l'actine dans le filopode. Les filaments d'actine sont ensuite réticulés en faisceaux grâce à la fascine et l' $\alpha$ -actinine. Au sein du filopode, les extrémités barbées des filaments d'actine sont orientées vers la membrane plasmique (Faix & Rottner, 2006). Selon des études, cette organisation unidirectionnelle permet aux moteurs myosines de transporter, entre autres, des récepteurs intégrines pour sonder l'environnement et établir les premières interactions avec la matrice extracellulaire (Mattila & Lappalainen, 2008). D'ailleurs, il a été démontré que les cellules qui migrent sur des surfaces en 2D forment à la base du filopode des



sites d'adhérence qui mûrissent pour devenir des adhésions focales lors du déplacement du lamellipode (Jacquemet, Hamidi, & Ivaska, 2015).

### **5.3 Le *bleb***

Le «bleb» est une protrusion membranaire d'apparence sphérique spécifique au processus d'apoptose. Mais de plus en plus, des études démontrent qu'elle joue aussi un rôle dans la migration des cellules primaires du développement et des cellules cancéreuses. Toutefois, elle n'apparaît que lorsque la migration a lieu dans des environnements tridimensionnels. Le bleb se forme assez rapidement, c'est pourquoi il peut être un moyen efficace pour explorer l'environnement extracellulaire. Deux mécanismes seraient impliqués dans l'initiation de la formation du bleb : le détachement du cortex d'actine de la membrane plasmique et/ou sa dégradation locale. C'est la contraction myosine, activée localement, qui est responsable de la rupture du cortex et qui induit sa délocalisation. De cela résulte une pression hydrostatique qui propulse la membrane plasmique vers l'avant. Initialement, le bleb en croissance ne comporte pas d'actine filamenteuse, mais au fur et à mesure, il se produit un assemblage du cortex d'actine à la membrane pour permettre la rétraction de la protrusion (Paluch & Raz, 2013).

### **5.4 *Invadopodia***

Au cours de leur migration, les cellules cancéreuses métastatiques peuvent alterner et utiliser les différents types de protrusions. Cette propriété semble leur permettre d'adopter des stratégies de migration selon l'environnement dans lequel elles se trouvent. Ces cellules ont un potentiel invasif associé à leur capacité de former des invadopodes. L'*invadopodia* est une protrusion qui a besoin de la présence des protéines N-WASP et de cortactine, potentiellement pour augmenter sa persistance. D'ailleurs, des études ont démontré que les invadopodes peuvent demeurer stables durant des heures. Ils expriment fortement les métalloprotéases, ce qui leur confère une grande capacité de dégradation de la matrice extracellulaire (Le Clainche & Carlier, 2008; Murphy & Courtneidge, 2011). Les invadopodes aident à initier la transition

épithélio-mésenchymateuse (TEM) durant laquelle il se produit un changement dans l'expression des protéines d'adhésion : la Cadhérine E , qui promeut l'adhésion, est réprimée; tandis que la Cadhérine-N, qui favorise l'invasion, est surexprimée (Lauffenburger & Horwitz, 1996).

## **6 Essais de migration et d'invasion *in vitro***

Lorsque les cellules cancéreuses acquièrent un fort potentiel invasif, elles se détachent de la tumeur primaire, envahissent et migrent à travers la matrice extracellulaire. Elles infiltrent ensuite la circulation sanguine et grâce au processus d'extravasation, se retrouvent dans un foyer distant où elles initient la formation d'une tumeur secondaire (Fricke et al., 2018). L'invasion et la migration cellulaires sont déterminants dans la progression métastatique. Pour étudier les mécanismes moléculaires qui les régulent, des essais *in vitro* permettant de reproduire une motilité directionnelle sur des substrats ou le mouvement cellulaire à travers une matrice tridimensionnelle ont été développés. Par ailleurs, il est important de mentionner que les essais 2D facilitent grandement les expériences de biochimie et de microscopie.

### **6.1 Surfaces d'adhésion**

Lorsque les cellules sont étalées sur des surfaces recouvertes de substrats de la matrice extracellulaire, notamment la fibronectine ou le collagène, leur adhésion *in vitro* et leur migration se font plus facilement. Les cellules s'aplatissent, se déforment, puis déclenchent une signalisation qui génère les forces contractiles de motilité (Cuvelier et al., 2007; Tegtmeier et al., 2010).

### **6.2 Essai de déplétion de sérum**

La croissance cellulaire est provoquée en privant, puis en stimulant les cellules avec du sérum, riche en cytokines et en facteurs de croissance. Ces composants activent les voies de

signalisation associées à la prolifération. Lorsque les cellules sont privées de sérum, leur activité basale est réduite entraînant leur synchronisation. Lorsqu'elles sont stimulées, elles déclenchent une réponse aux chimioattractants entraînant la formation de protrusions (Pirkmajer & Chibalin, 2011).

### **6.3 Essai de cicatrisation**

Cet essai s'inspire du processus de réparation des lésions *in vivo* qui exige la migration cellulaire. Il s'agit de créer une «plaie» artificielle sur une monocouche de cellules confluentes pour constater que celles-ci vont migrer pour la refermer (C.-C. Liang, Park, & Guan, 2007; Vogt, 2010).

### **6.4 Essai de la chambre modifiée de Boyden**

Cette technique consiste à faire migrer des cellules à travers une membrane poreuse pour reproduire les processus d'invasion et de migration. Les cellules sontensemencées dans le compartiment supérieur de la chambre en absence de sérum. Pour stimuler leur transmigration, des agents chimiotactiques ou des protéines de la matrice extracellulaire sont rajoutés dans le compartiment inférieur (Kramer et al., 2013). La taille des pores de la membrane utilisée doit varier entre 1  $\mu\text{m}$  ou moins et 3  $\mu\text{m}$  afin de ne permettre que le passage des protrusions et pas de la cellule entière. En effet, l'utilisation d'une membrane dont la taille des pores est de 1  $\mu\text{m}$  permet l'infiltration et le passage des protrusions, mais pas des noyaux et des autres organelles cellulaires. Par contre, l'utilisation d'une membrane dont la taille des pores est de 3  $\mu\text{m}$  ou plus peut permettre le passage des noyaux et des mitochondries et ce, dans le cas où la migration des cellules dure plus de 24h (Shankar & Nabi, 2011). Une contamination de la fraction de la protrusion avec le matériel biologique de la fraction du corps cellulaire peut alors survenir (Shankar & Nabi, 2011). Néanmoins, les ARNs des protrusions et ceux des parties restantes des cellules (appelées corps cellulaires) sont ensuite extraits, puis soumis à des dosages biochimiques afin de comparer leur localisation.

## 7 ARNm enrichis au niveau des protrusions cellulaires

Depuis l'introduction de la chambre modifiée de Boyden, des centaines d'ARNm enrichis aux protrusions ont été identifiés dans différents types cellulaires (Mardakheh et al., 2015). Mili, Moissoglu *et al* ont été les premiers à démontrer à l'échelle génomique la distribution asymétrique des ARNs au niveau des protrusions de cellules de mammifères. Dans leur étude, les chercheurs ont d'abord isolé les protrusions et les corps cellulaires (*cell bodies*) des fibroblastes NIH/3T3. Pour ce faire, ils ont étalé les cellules sur une membrane dont les pores sont de 3  $\mu$ m et l'ont recouverte de fibronectine (FN), puis ils ont ajouté de l'acide lysophosphatidique (LPA) dans le compartiment inférieur de la chambre pour stimuler la transmigration. Ensuite, en utilisant la technique des puces à ADN, ils ont analysé, puis comparé les niveaux d'expression des gènes des deux fractions cellulaires obtenues. Ils sont parvenus à déterminer que plus de 50 ARNm s'accumulent au niveau des protrusions des fibroblastes. La plupart de ces ARNm encodent pour des protéines de régulation du cytosquelette d'actine, du transport via les microtubules et du métabolisme de l'ARN. Ils ont ensuite étudié par imagerie de cellules vivantes les mécanismes de localisation de deux ARNm candidats fortement enrichis, dont l'un encode pour la GTPase Rab13 et l'autre pour la protéine plakophiline (Pkp), qui est une composante du desmosome. Ainsi, ils ont démontré que ces transcrits sont ancrés aux extrémités (+) des microtubules détyrosinés par le biais de leur 3'-UTR et qu'ils s'y accumulent sous forme de granules. Ils ont aussi démontré que ces transcrits sont associés au suppresseur de tumeur APC (*adenomatous polyposis coli*), récemment catégorisé comme une protéine de liaison à l'ARN (Mili, Moissoglu, & Macara, 2008a).

Dans une seconde étude, Wang, Hamilla *et al.*, ont pu caractériser les voies qui régulent la localisation des ARNm au niveau des protrusions des fibroblastes. D'abord, par séquençage à haut débit de l'ARN, les chercheurs ont constaté que les ARNs localisés se divisent en deux groupes : les ARNs dont la localisation dépend de la protéine APC et ceux dont la localisation n'en dépend pas. Les ARNs dont la localisation dépend de la protéine APC encodent pour des protéines qui régulent la croissance, l'assemblage et l'organisation cellulaires, alors que les ARNs dont la localisation ne dépend pas de la protéine APC encodent plutôt pour des

protéines ribosomales. Ils ont alors suggéré un mécanisme qui explique la voie APC-dépendante, où la contractilité actomyosine active la voie de signalisation RhoA-mDia1 qui, à son tour, conduit à la formation d'un réseau de microtubules nécessaire à la localisation des ARNm assurée par la protéine APC (T. Wang, Hamilla, Cam, Aranda-Espinoza, & Mili, 2017). De plus, Yasuda, Zhang, *et al* ont démontré que la protéine Fus (*Fused in sarcoma*) est une composante du complexe ribonucléoprotéique APC-RNPs et qu'elle promeut la traduction des ARNm associés à APC spécifiquement au niveau des protrusions (Yasuda et al., 2013).

Par ailleurs, l'enrichissement aux protrusions de l'ARNm de la plakophiline (Pkp) a été identifié dans plusieurs types de cellules. La plakophiline est une protéine des jonctions intercellulaires. Elle régule l'assemblage du cytosquelette à la membrane plasmique en liant les filaments intermédiaires aux cadhérines membranaires (Niell et al., 2018). Dans une étude, Jakobsen, Kristine Raaby, *et al* ont montré que plusieurs isoformes de l'ARNm Pkp s'accumulent au niveau des protrusions des cellules métastatiques du cancer du sein MDA-MB-231. Par contre, aux protrusions des cellules non-métastatiques MCF-7, ils ont constaté que ces isoformes ne s'accumulent pas. Ces chercheurs suggèrent que la localisation des différents isoformes du transcrit Pkp pourrait être impliquée dans la régulation des processus d'invasion et de formation de métastases. Selon eux, les isoformes de Pkp qui sont exprimés localement affecteraient négativement la régulation des jonctions intercellulaires, ce qui favoriserait la transition épithélio-mésenchymateuse, et par le fait même le processus d'invasion des cellules métastatiques du cancer du sein. Toutefois, pour les chercheurs, cette hypothèse reste à démontrer (Jakobsen et al., 2013).

Dans les protrusions des cellules hautement invasives du cancer du sein MDA-MB-23, Mardakheh, FarazK, *et al* ont démontré que la distribution et le taux de traduction des ARNm localisés n'ont pas de corrélation avec ceux des protéines localisées. Ces chercheurs ont étudié plusieurs protéines localisées et traduites aux protrusions et ont observé que leurs ARNm ne sont pas enrichis. Inversement, ils ont trouvé que les ARNm qui encodent pour des protéines mitochondriales, des protéines de liaison à l'ARN et des protéines ribosomales sont enrichis au

niveau des protrusions, mais sont faiblement traduits. Ils suggèrent que ces ARNm sont potentiellement réprimés. Pour justifier le faible taux de traduction de ces transcrits, les chercheurs proposent deux explications: soit la localisation est un moyen de répression globale de la traduction permettant de maintenir les ARNm loin de leur site d'action (corps cellulaire), soit la traduction doit être activée par une voie de régulation spécifique et qui s'apparente à celle de l'ARNm  $\beta$ -actine dont la traduction est activée par phosphorylation (Mardakheh et al., 2015).

## **8 Transcrits enrichis aux protrusions des cellules du carcinome hépatocellulaire**

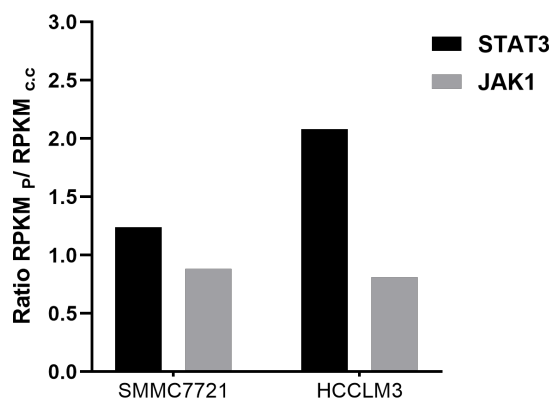
Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cancer du foie le plus répandu dans le monde. Le principal facteur de risque de ce cancer est une cirrhose du foie, qui peut être causée par le virus de l'hépatite B ou C, une intoxication par les aflatoxines, une cholestase, par l'alcool ou les maladies métaboliques (Okuda, 2007).

Liu, Yan-hong, *et al*, nos collaborateurs de Chine, ont utilisé la technique de la chambre modifiée de Boyden pour fractionner les protrusions et les corps cellulaires des cellules du carcinome hépatocellulaire. Pour cela, ils ont étalé les cellules CHC sur une membrane dont les pores sont de 1  $\mu$ m et l'ont recouverte de collagène, puis ils ont ajouté du sérum dans le compartiment inférieur de la chambre pour stimuler la transmigration. 24 à 30 heures après, ils ont récupéré les protrusions et les corps cellulaires desquels ils ont extrait et purifié l'ARN total. Ensuite, ils ont quantifié les ARNm présents dans chaque fraction cellulaire par séquençage direct de l'ARN à haut débit. Puis, ils ont normalisé le nombre de *reads* en valeurs de RPKM ( *Reads per kilo base per million mapped reads* ) afin de déterminer l'abondance relative des ARNm localisés dans les protrusions en la comparant à celle des corps cellulaires,. Pour cela, ils ont divisé la valeur de RPKM de chaque ARNm localisé dans la protrusion par la valeur RPKM du même ARNm localisé dans le corps cellulaire (ratio Ps/C.c). Pour ces chercheurs, lorsqu'un ARNm donné a un ratio Ps/C.c d'une valeur de plus de 1.6, cela indique qu'il est plus abondant dans la fraction protrusion que dans la fraction corps cellulaire.

À partir de ce calcul, Liu, Yan-hong, *et al* ont déterminé qu'au niveau des protrusions de la lignée CHC métastatique (HCCLM3), certains transcrits sont enrichis et que dans les protrusions cellulaires de la lignée CHC non-métastatique (SMMC7721), ces transcrits ne sont pas enrichis. STAT3 compte parmi les ARNm enrichis aux protrusions des cellules métastatiques HCCLM3 et JAK1 parmi ceux qui ne sont pas enrichis. Le tableau I regroupe les données d'ARN-Seq obtenues pour ces deux transcrits. La figure 4 illustre leur rapport  $RPKM_{Ps} / RPKM_{C.C.}$ .

**Tableau I.** Données d'ARN-Seq pour les ARNm STAT3 et JAK1

<b>Lignée CHC</b>	<b>Nom du gène</b>	<b>RPKM corps cellulaire</b>	<b>RPKM protrusion</b>	<b>Ratio <math>RPKM_{Ps} / RPKM_{C.C.}</math></b>
<b>SMMC7721</b>	<b>STAT3</b>	29.79	37	<b>1.24</b>
	<b>JAK1</b>	51.93	45.75	<b>0.88</b>
<b>HCCLM3</b>	<b>STAT3</b>	23.04	47.91	<b>2.08</b>
	<b>JAK1</b>	24.38	19.63	<b>0.81</b>



**Figure 4. Localisation relative des ARNm STAT3 et JAK1 dans les protrusions des lignées CHC.** Représentation graphique de données extraites des résultats supplémentaires de Liu, Jin et al. 2016. Pour les cellules métastatiques HCCLM3, le ratio RPKM<sub>ps</sub>/ RPKM<sub>c.c</sub> de l'ARNm STAT3 est plus grand que 1.6, ce qui indique qu'il est plus abondant dans la fraction protrusion que la fraction corps cellulaire.

Ces chercheurs ont catégorisé les ARNm enrichis au niveau des protrusions des cellules HCCLM3 en quatre groupes en se basant sur le rôle qu'ils jouent dans le développement du cancer, la motilité cellulaire, la synthèse et la modification des protéines ainsi que dans l'assemblage et l'organisation cellulaires. Ensuite, ils se sont intéressés à trois gènes connus pour leur implication dans le développement de tumeurs, à savoir le facteur de transcription p53 (TP53), le facteur d'élongation de la traduction eEF2 et le facteur de transcription et de transduction STAT3 afin d'approfondir leur analyse de la lignée métastatique. Pour cela, ils ont fractionné les protrusions et les corps cellulaires dans la chambre modifiée de Boyden. Puis, à l'aide de la technique d'immunobuvardage de type Western, ils ont évalué les niveaux d'expression des protéines TP53, eEF2 et de STAT3 dans chaque fraction. Ils ont trouvé que les niveaux d'expression de la protéine STAT3 étaient plus élevés dans la fraction des protrusions que dans la fraction des corps cellulaires, mais que les niveaux d'expression de TP53 et de eEF2 étaient similaires dans les deux fractions. Ils en ont conclu qu'il y avait une accumulation de l'ARNm STAT3 et de sa protéine au niveau des protrusions des cellules métastatiques. Par la suite, ils ont exploré le rôle de la protéine STAT3 en déplantant son expression par interférence ARN dans les cellules métastatiques HCCLM3 et ils ont constaté que leur potentiel invasif a diminué. Finalement, en faisant une co-immunoprécipitation, ils



ont détecté une interaction entre la protéine STAT3 et le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) (Liu et al., 2016).

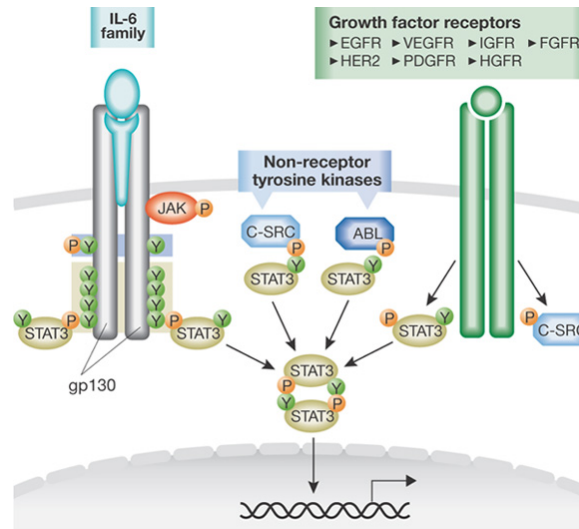
## 8.1 STAT3

La famille des protéines STAT (*signal transducer et activator of transcription*) comprend sept membres qui peuvent agir comme des molécules de signalisation cytoplasmique ou comme des facteurs nucléaires de transcription (Yu & Jove, 2004). Pour STAT3, il est déterminant dans la progression tumorale, mais des études continuent à approfondir la complexité de son rôle.

### 8.1.1 Activation de STAT3

D'un côté, STAT3 peut être activé à la membrane par les récepteurs des facteurs de croissance à activité tyrosine-kinase intrinsèque (**Figure 4**) (Bollrath & Greten, 2009). D'un autre côté, il peut être activé par les récepteurs des interleukines ou des cytokines qui, n'ayant pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque, recrutent les kinases Janus (JAK) pour le phosphoryler. Il s'ensuit une dimérisation et une translocation au noyau de la protéine, qui induit l'expression de gènes cibles.

Dans les cellules tumorales, les récepteurs des facteurs de croissance sont constitutivement actifs à cause de mutations ou de stimulation excessive par des cytokines (IL-6 et IL-22) ou de facteurs de croissance (EFG). Il n'est donc pas surprenant de constater qu'une activation persistante de STAT3 phosphorylé soit observée dans un nombre croissant de cancers (Kamran, Patil, & Gude, 2013). Toutefois, des études récentes suggèrent que même sous sa forme non phosphorylée, STAT3 peut être impliqué dans l'expression des gènes (Yang et al., 2005).



**Figure 5. Voies d'activation de STAT3** : les interleukines lient leur récepteur et entraînent son hétérodimérisation avec le récepteur gp130. Cela active les protéines JAK qui, en phosphorylant les résidus tyrosines cytoplasmiques du récepteur gp130, induisent le recrutement de STAT3 monomérique. Le facteur STAT3 est alors phosphorylé, ce qui provoque sa dimérisation et sa translocation au noyau. Les récepteurs des facteurs de croissance épidermique (EGFR) et endothélial vasculaire (VEGFR) activent la protéine STAT3 grâce à leur activité tyrosine-kinase intrinsèque (Bollrath & Greten, 2009).

## 8.2 Mécanismes d'invasion et de migration cellulaires impliquant STAT3

Des études démontrent que STAT3 a un rôle dans la migration et l'invasion cellulaires. Par exemple, la protéine WASF3, qui régule la dynamique du cytosquelette d'actine dans le lamellipode en recrutant le complexe Arp2/3, promeut l'invasion via la voie JAK-STAT3. Lorsqu'il y a une stimulation à l'interleukine 6, la protéine STAT3 lie des éléments du promoteur du gène WASF3 et induit sa surexpression (Y. Teng, Liu, & Cowell, 2011). Ensuite, WASF3 est recrutée à la membrane où elle est phosphorylée et activée par la kinase JAK2 entraînant la formation d'un grand nombre de protrusions (Y. Teng, Ross, & Cowell, 2014).

Une autre étude suggère que STAT3 a une fonction cytoplasmique dans le maintien de la migration directionnelle. Par exemple, dans les fibroblastes embryonnaires de souris, une perte de l'expression de STAT3 augmente fortement l'activité de Rac1, ce qui conduit les cellules à

adopter une migration aléatoire où la persistance directionnelle et la formation de fibres de stress sont réduites. Lorsque l'activité de STAT3 est réintroduite dans les cellules par la surexpression d'un mutant ayant un défaut transcriptionnel, le phénotype migratoire normal des cellules est rétabli (Kaptein, Paillard, & Saunders, 1996). Cela s'explique par l'interaction endogène indentifiée entre STAT3 et  $\beta$ PIX. Le facteur d'échange de la guanine  $\beta$ PIX est ciblé au lamellipode où il active Rac1. Il semble que la liaison de STAT3 à  $\beta$ PIX peut potentiellement affecter l'oligomérisation de  $\beta$ PIX et entraîner la suppression de l'activation de Rac1 induite par  $\beta$ PIX (T. S. Teng, Lin, Manser, Ng, & Cao, 2009). Cette interaction pourrait représenter un mécanisme par lequel la protéine STAT3 cytoplasmique régule la migration via la voie  $\beta$ PIX-Rac1.

### **8.3 L'expression de STAT3 dans les cancers métastatiques**

Dans les cancers métastatiques, les niveaux d'expression de STAT3, évalués au niveau de la protéine et de l'ARNm, sont élevés. Or, une étude a démontré que dans les cellules invasives de l'épithélium intestinal, l'expression de la protéine STAT3 est augmentée alors que celle de son ARNm ne l'est pas. Il est donc possible de penser que lorsque les cellules tumorales acquièrent le phénotype métastatique, l'expression de la protéine STAT3 est affectée, et ce, indépendamment des niveaux de son ARNm. En effet, dans de multiples cancers, la protéine STAT3 est constitutivement active. Dans les cellules cancéreuses où la protéine STAT3 est constamment active, il est possible de supposer que l'expression de son ARNm diminue et devienne moins nécessaire (Lassmann et al., 2007).

### **8.4 STAT3 dans le carcinome hépatocellulaire**

Dans le carcinome hépatocellulaire, STAT3 est considéré comme un oncogène, car le fait d'interférer avec son activité promeut l'apoptose et nuit à la prolifération de plusieurs lignées cellulaires d'hépatomes *in vitro* ainsi que dans des modèles de transplantation *in vivo* (Svinka, Mikulits, & Eferl, 2014). De plus, la protéine STAT3 nucléaire phosphorylée au niveau de la tyrosine 705 est présente dans 60% des cas de CHC et corrèle avec une

progression de la tumeur et un pronostic fatal (Svinka et al., 2014). Mais l'activité oncogénique de STAT3, spécifiquement dans la progression du carcinome hépatocellulaire, demeure encore mal comprise. Un enrichissement de l'ARNm de STAT3 et une traduction locale de la protéine au niveau des protrusions des cellules CHC peut représenter un mécanisme qui contribuerait au développement de métastases (Liu et al., 2016).

## **9 Méthodes d'études du trafic de l'ARNm**

### **9.1 CeFra-seq**

L'intérêt grandissant d'approfondir les connaissances du trafic global de l'ARN a mené au développement de nouvelles approches. Récemment, une technique combinant le fractionnement biochimique de cellules cultivées et le séquençage de l'ARN à haut débit (CeFra-seq) a été développée. Les extraits nucléaires, cytoplasmiques, membranaires ou extracellulaires de cellules en culture sont d'abord isolés grâce à un protocole de fractionnement adapté. Le transcriptome de chaque fraction est ensuite caractérisé grâce un séquençage en profondeur de l'ARN à haut débit. Systématiquement, des profils globaux de la distribution spatiale des ARN à travers la cellule sont établis (Lefebvre et al., 2017). Le CeFra-seq devient donc un outil puissant lorsqu'il s'agit d'examiner les changements globaux dans les distributions de l'ARN associés à des pathologiques ou à des altérations génétiques ou environnementales.

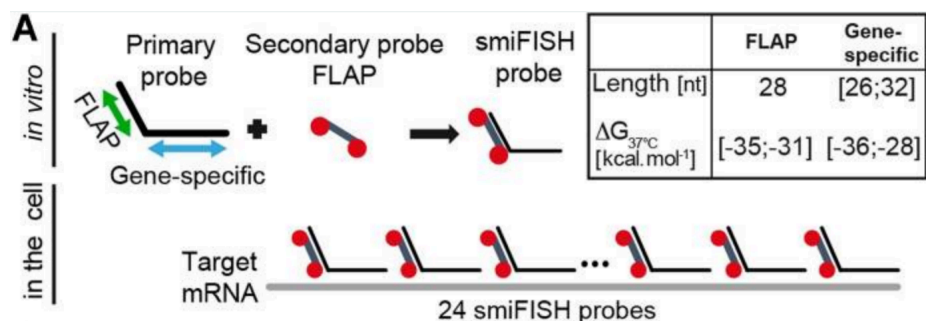
### **9.2 Imagerie par fluorescence**

L'utilisation des techniques d'imagerie par fluorescence de l'ARN (FISH) et de protéines facilitent la visualisation directe de leur distribution spatiale dans certains compartiments cellulaires spécifiques.

### 9.2.1 Hybridation *in situ* en fluorescence de molécules uniques (*smiFISH*)

L'hybridation *in situ* consiste à appairer à un ARN cible un ou plusieurs oligonucléotides de séquence complémentaire, fluorescente et très spécifique (Spille & Kubitscheck, 2015). Le *single molecule inexpensive FISH* est une approche qui se base sur la technique d'hybridation *in situ* traditionnelle, mais qui est très flexible et surtout peu coûteuse. À l'aide d'un script bioinformatique appelé *OligoStan*, des sondes «primaires» qui ciblent n'importe quel ARNm et dont l'appariement est favorable à 37°C sont générées. Pour avoir un bon signal fluorescent, au moins 24 sondes primaires sont sélectionnées. Pour amplifier le signal et le faire ressortir du bruit de fond, il est possible d'utiliser jusqu'à 48 sondes primaires. À chacune de ces sondes est ajoutée en 3' une même séquence «FLAP» sur laquelle peut s'hybrider une sonde secondaire fluorescente. Grâce à ce design expérimental, il est possible de visualiser et d'analyser des molécules uniques d'ARNm endogènes avec une bonne résolution. En microscopie, la résolution représente la capacité de l'instrument optique à résoudre deux points lumineux situés à proximité et à les discerner l'un de l'autre (Huang, Bates, & Zhuang, 2009). Lorsque la lumière est transmise à travers l'objectif, elle diffracte. Sur le plan image, cela résulte non pas en un point, mais plutôt en une «tâche» lumineuse floue dont la répartition d'amplitude est définie par la fonction d'étalement du point (*Point spread function* ou PSF) (Goure, 2011). C'est ce phénomène optique qui limite la discrimination spatiale de deux points sources, et par conséquent, la résolution de structures biologiques proches (Klar, Jakobs, Dyba, Egner, & Hell, 2000). Dans le contexte du *smiFISH*, il est essentiel d'avoir une résolution qui permet de distinguer chaque molécule d'ARNm unique marquée.

Par ailleurs, avec le *smiFISH*, il est même possible de procéder à une double détection de deux ARNm différents si, par exemple, l'un est marqué par le fluorophore Cy3 et l'autre par le fluorophore Cy5 (Tsanov et al., 2016). Le *smiFISH* permet de quantifier le nombre exact de molécules d'ARNm uniques exprimées dans une cellule. Mais avec cette technique, il n'est possible de visualiser qu'un nombre limité d'ARN à la fois (Li & Neuert, 2019).



**Figure 6. Design expérimental du smiFISH:** À l'aide du script *OligoStan*, 24 séquences ciblant un ARNm d'intérêt sont générées. Une séquence «FLAP» est ajoutée à l'extrémité 3' des sondes primaires. Une sonde secondaire fluorescente est pré-hybridée au «FLAP» *in vitro*. Dans la cellule, les sondes primaires marquées appariées l'ARNm cible à 37°C (Tsanov et al., 2016).

## 9.2.2 MERFISH

Pour mieux comprendre l'implication de l'organisation spatiale des ARNs dans la régulation post-transcriptionnelle, une méthode de visualisation à l'échelle du transcriptome a été développée. Nommée hybridation *in situ* en fluorescence multiplexée à erreur-robuste ou MERFISH (*multiplexed error-robust fluorescence in situ hybridization*), cette technique permet d'établir simultanément les profils de distribution de centaines d'ARN dans une seule cellule. Des sondes comprenant à la fois la séquence qui cible l'ARN d'intérêt et la séquence de «lecture» (*readout*) à laquelle peut s'hybrider une séquence «lecture» complémentaire, couplée à un fluorophore, sont utilisées pour marquer les ARNs. Pour identifier ces derniers, des cycles d'hybridation et d'imagerie successifs sont effectués. Après chaque cycle, le signal renvoyé par chaque sonde de «lecture» est analysé afin de déterminer s'il y a présence ou absence de fluorescence. S'il y a fluorescence, un code «1» est assigné à l'ARN, et s'il n'y en a pas, le code «0» est assigné à l'ARN. Ce processus séquentiel d'hybridation et d'imagerie est répété  $N$  fois pour donner un code-barres de  $N$ -chiffres représentant la combinaison des sondes de «lecture» liées à chaque ARN détecté. Des erreurs de détection peuvent se produire et augmenter avec le nombre de cycles. Pour minimiser l'accumulation des erreurs, des protocoles robustes de détection et de correction sont mis en place (Moffitt & Zhuang, 2016; Xia, Babcock, Moffitt, & Zhuang, 2019).

## **Problématique et Hypothèse**

La localisation de l'ARNm est une des voies de régulation des processus biologiques dans les cellules germinales tout comme dans les cellules somatiques. Toutefois, le mécanisme de localisation de l'ARNm est encore peu connu pour avoir un rôle dans le développement des cancers. De plus en plus d'études essaient de comprendre son implication dans la progression des tumeurs. À cet effet, une étude de séquençage direct de l'ARN à haut débit de Liu, Yan-hong, et al., réalisée sur les cellules du carcinome hépatocellulaire (HCCLM3) métastatique (HCCLM3), a identifié des transcrits enrichis au niveau de leurs protrusions. Comparativement, dans les protrusions des cellules du carcinome hépatocellulaire (SMMC7721) non-métastatiques, ces mêmes transcrits ne le sont pas. Parmi les ARNm enrichis aux protrusions des cellules métastatiques, il y a STAT3. En se basant sur ce résultat de nos collaborateurs, nous émettons l'hypothèse selon laquelle le mécanisme de localisation de l'ARNm STAT3 favoriserait son expression et l'activation de sa protéine spécifiquement au niveau des protrusions. Ceci suggère qu'il serait possiblement impliqué dans la régulation de la migration et l'invasion des cellules du cancer hépatique associées à un phénotype métastatique.

## Objectifs

Pour tester cette hypothèse, notre objectif principal consiste à valider l'enrichissement de l'ARNm STAT3 dans les protrusions des cellules CHC associées à un phénotype métastatique par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence sur molécules uniques (*smiFISH*). Pour cela, nous avons mis au point un essai *in vitro* qui permet aux cellules CHC de former des protrusions sur la surface d'une lamelle de verre. Ensuite, nous avons procédé au marquage des adhésions focales qui se forment dans la région délimitant la protrusion du corps cellulaire (*lamella* ) en exprimant l' $\alpha$ -actinine-GFP dans les cellules CHC. Puis, nous avons procédé à la détection des molécules uniques de STAT3 par *smiFISH* et à la quantification de sa distribution relative dans les deux régions sous-cellulaires pour déterminer s'il est enrichi au niveau des protrusions. Finalement, nous avons démontré que les sondes *smiFISH* sont bel et bien spécifiques à l'ARNm STAT3 en déplaçant son expression par shRNA.



## **Matériel et Méthodes**

### **Culture cellulaire**

Les lignées (CHC) du carcinome hépatocellulaire SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H ont été obtenues de l'Institut Médical Wenzhou (Chine) et ont été cultivées dans un milieu DMEM (Sigma-Aldrich) qui comprend 10% de sérum de veau fœtal (FBS, Gibco), 1% de L-alanine-L-glutamine (GlutaMAX, Gibco) et 1% de Pénicilline-streptomycine (Wisent). On a assuré leur croissance en procédant à des passages réguliers à la trypsine-EDTA 0.25% (Sigma-Aldrich) et en les maintenant dans un incubateur humide dont l'atmosphère se compose de 5% de CO<sub>2</sub> et dont la température s'élève à 37°C.

### **Expression stable de l' $\alpha$ -actinine-GFP dans les lignées CHC**

#### Clonage du vecteur lentiviral pHAGE-EF1a- $\alpha$ -actinine-GFP-IRES-hygro

La séquence encodant la protéine de fusion  $\alpha$ -actinine-GFP contenue dans le plasmide pEGFP-N1 alpha-actinin 1 (Addgene) a été clonée dans le vecteur lentiviral pHAGE2-EF1a-MCS-IRES-hygro (Addgene). L'intégration de la séquence a été vérifiée par digestion enzymatique et par séquençage à l'aide de l'amorce TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC qui lie le promoteur EF1- $\alpha$ . Le plasmide recombinant a par la suite été transformé dans des bactéries compétentes DH5- $\alpha$  par choc thermique. Ensuite, les clones ayant intégré le plasmide ont été sélectionnés sur un milieu LB solide contenant 50 $\mu$ g/mL d'ampicilline, puis mis en culture dans un milieu liquide. Finalement, l'ADN plasmidique en a été extrait à l'aide du kit GeneJET Plasmid Maxiprep de Thermo Fisher.

#### Production du lentivirus

La préparation du lentivirus a été réalisée à l'aide de vecteurs viraux d'emballage de troisième génération. Le jour précédent la transfection, 5 millions de cellules HEK-293 FT de bas passage ont étéensemencées dans un pētri 100 mm. Le lendemain, celles-ci ont été

transfectées à l'aide d'une solution de transfection comprenant 3 µg du vecteur lentiviral pHAGE-EF1a- $\alpha$ -actinine-GFP-IRES-hygro, 2 µg du vecteur delta 8.9, 1 µg du vecteur VSVG1, 500 µl de tampon JetPrime et 12 µl d'agent de transfection JetPrime. En parallèle, une transfection servant de contrôle positif a été faite avec le vecteur pHAGE-UBC-Mcbp-sfGFP (Addgene). Après 24 heures d'attente, le milieu de culture des HEK-293 FT transfectées a été remplacé et les lignées CHC à infecter ont étéensemencées dans une plaque à 6 puits. L'efficacité de transfection des HEK-293 FT a été évaluée en observant le taux d'expression de GFP au microscope inversé Nikon Eclipse TE2000U 48 heures après la transfection. Le milieu de culture (surnageant) qui recouvre les cellules HEK-293 FT exprimant positivement GFP contient les particules lentivirales. De ce fait, il a été récupéré et purifié des débris cellulaires à l'aide d'un filtre à seringue PES de 0.45 microns (Millipore).

#### Concentration du lentivirus et infection

Malgré l'utilisation de la totalité du surnageant contenant les particules lentivirales, l'infection des lignées cellulaires CHC s'est révélée peu efficace. Par conséquent, avant de l'utiliser, le lentivirus pHAGE-EF1a- $\alpha$ -actinine-GFP-IRES-hygro a été concentré à l'aide du kit de filtres à centrifuger Amicon Ultra-15 (EMD Millipore) en suivant le protocole du fabricant. À partir du culot obtenu, 1 mL de lentivirus a été prélevé et mélangé à 2 mL de milieu de culture et à du polybrène concentré à 8 µg/mL. Le tout a été réparti de manière à recouvrir les cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H étalées dans trois puits différents. En parallèle, une infection servant de contrôle positif a été faite avec le le lentivirus concentré pHAGE-UBC-Mcbp-sfGFP. Après 24 heures d'incubation, le milieu de culture des lignées CHC infectées a été remplacé. 48 heures après l'infection, l'expression de GFP a été observée.

#### Tri des lignées CHC exprimant l' $\alpha$ -actinine-GFP par cytométrie en flux

Les populations de cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H infectées avec les lentivirus concentrés pHAGE-EF1a- $\alpha$ -actinine-GFP-IRES-hygro et pHAGE-UBC-Mcbp-sfGFP ont été amplifiées , puis préparées pour le tri au FACS. Les cellules ont d'abord été

lavées au PBS 1X, détachées à l'aide de la trypsine, centrifugées à 300 g durant 5 min, puis resuspendues dans une solution PBS contenant 3% de sérum (FBS). En se basant sur l'analyse des lignées CHC exprimant le lentivirus contrôle positif pHAGE-UBC-Mcbp-sfGFP, la technicienne a établi les paramètres du tri. Puis, à l'aide du trieur BD FACS Aria, des cellules CHC exprimant fortement l' $\alpha$ -actinine-GFP ont été collectées dans une solution de sérum (FBS) pur, puis remises en culture en présence de 50  $\mu$ g/mL de gentamicine.

## **Déplétion de STAT3 dans les lignées CHC**

La déplétion de STAT3 a été effectuée avec le vecteur lentiviral pLKO shRNA STAT3 A puro, offert par le laboratoire du Dr. Ferbeyre. Le vecteur lentiviral pLKO.1 shRNA scrambled puro a servi de contrôle négatif de la déplétion. Les lentivirus nécessaires à l'infection ont d'abord été produits selon le protocole décrit précédemment. Puis, ils ont été ajoutés aux cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97Hensemencées dans des plaques de culture à 6 puits. Finalement, les cellules ayant intégré les constructions virales ont été sélectionnées à la puromycine concentrée à 2  $\mu$ g/mL et ce, durant trois jours.

### Extraction et préparation de l'ARN

Dans une plaque de culture à 6 puits, les lignées CHC déplétées par shRNA STAT3 A et par shRNA scrambled ont étéensemencées à une densité de  $1 \times 10^6$  cellules par puits. Ensuite, leur ARN total a été extrait au Trizol (Invitrogen) en suivant les directives du fabricant. Une quantité de 2  $\mu$ g de chaque échantillon d'ARN total a été soumise à un traitement à l'ADNase I dans un tampon  $MgCl_2$  1X (EN0521, Thermo Fisher) afin d'éliminer de possibles contaminations à l'ADN génomique. L'ajout de 50mM d'EDTA et une incubation à 65°C ont par la suite été effectués pour inactiver l'enzyme.

### Synthèse de l'ADNc (RT)

Chaque échantillon d'ARN préparé a été converti en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit de la transcriptase inverse SuperScript II d'Invitrogen. La réaction de transcription inverse contenait 1 µg d'ARN total, 200 ng d'amorces hexamères aléatoires, 10mM de chaque dNTP, le tampon First-Strand 5X, 0.1M DTT, 40 unités de Ribolock, de l'eau DEPC ainsi que 200 unités de la Supertranscriptase II. La synthèse a été réalisée selon le programme thermique suivant: une incubation initiale à 25°C durant 10 min, suivie d'une incubation à 42°C durant 50 min, suivie d'une incubation à 70°C durant 15 min.

### qPCR

L'ADNc synthétisé a été dilué 8 fois avant d'être amplifié par PCR en temps réel dans un volume total de 20 µl. Chaque réaction incluait l'ADNc, 10 µM de l'amorce sens, 10 µM de l'amorce anti-sens, de l'eau DEPC et 1X du mixte Luna (NEB) qui contient le marqueur SYBR Green I ainsi que l'ADN polymérase *Taq* Hot Start. Les séquences d'amorces ciblant les gènes STAT3 et Rplp0 figurent au tableau II. L'amplification a été exécutée dans le thermocycleur LightCycler 96 (Roche Life Science) selon le programme suivant: une dénaturation initiale à 95°C durant 60 sec, suivie de 45 cycles d'amplification en 2 étapes; soit une étape de dénaturation à 95°C durant 15 sec suivie d'une étape d'hybridation et d'élongation à 60°C durant 30 sec. Pour confirmer la présence d'un seul amplicon, une courbe de fusion a été générée pour chaque cycle d'amplification. L'évaluation de l'expression relative (QR) du transcrit STAT3 selon le gène de référence Rplp0 a été faite en utilisant la méthode de Pfaffl.

$$ratio = \frac{(E_{STAT3})^{\Delta CP_{STAT3} (HCC\ scrambled - HCC\ déplétée)}}{(E_{Rplp0})^{\Delta CP_{Rplp0} (HCC\ scrambled - HCC\ déplétée)'}}$$

où **E** réfère à l'efficacité d'amplification du gène en question.

**Tableau II.** Amorces utilisées en RT-qPCR

Amorces	Séquences
<i>STAT3_sens</i>	GCCTAGATCGGCTAGAAAAGTGA
<i>STAT3_anti-sens</i>	CCCCTTTGTAGGAACTTTTGCTG
<i>Rplp0_sens</i>	ACATCTCCCCCTTCTCCTT
<i>Rplp0_anti-sens</i>	CAGACAGACACTGGCAACA

### **Essais de formation de protrusions cellulaires sur lamelles**

Pour tous les essais effectués, les lamelles de verre 22x22 mm ont été incubées dans une solution HCl pur durant 24 heures afin de permettre l'adhérence des cellules CHC à leur surface. Ensuite, elles ont été lavées à l'eau DEPC et maintenues dans l'éthanol 70% jusqu'à utilisation.

#### Essai d'étalement sur lamelle non-traitée

Les cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H exprimant l' $\alpha$ -actinine-GFP ont étéensemencées sur des lamelles de verre nu et laissées à adhérer à ces dernières pendant 24 à 48 heures. Puis, elles ont été fixées avec de la paraformaldéhyde 4% durant 20 min pour l'imagerie en fluorescence.

#### Essai d'étalement sur lamelle traitée à la fibronectine

Une solution DMEM contenant 10  $\mu$ g/ $\mu$ L de fibronectine plasmatique humaine (FC010, EMD Millipore) a été préparée et répartie sur les lamelles de verre, qui ont ensuite été incubées à 37°C durant 1 heure. Puis, des cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H exprimant l' $\alpha$ -actinine-GFP ont étéensemencées sur leurs surfaces recouvertes de fibronectine

et laissées y adhérer durant 24 à 48 heures avant d'être fixées à la paraformaldéhyde 4% pour l'imagerie en fluorescence.

#### Essai de déplétion de sérum

Les lignées CHC exprimant l' $\alpha$ -actinine-GFP ont été ensemencées sur des lamelles de verre nu dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum. Après 24 heures d'incubation, ce milieu a été remplacé par un autre qui ne contient pas de sérum et dans lequel les cellules CHC ont été laissées pendant 24 heures avant d'être réintroduites dans un autre milieu contenant du sérum. Finalement, les cellules ont été fixées à la paraformaldéhyde 4% pour l'imagerie en fluorescence.

#### Essai de cicatrisation

Les lignées CHC exprimant l' $\alpha$ -actinine-GFP ont été ensemencées sur les lamelles de verre nu de manière à recouvrir leur surface d'une monocouche cellulaire. Ensuite, une «plaie» a été induite sur cette monocouche. Les débris cellulaires qui en ont résulté ont été éliminés par des lavages répétitifs au PBS 1X. Les cellules ont été laissées incuber pendant 48 heures afin de permettre à la plaie de se refermer. Finalement, les cellules ont été fixées à la paraformaldéhyde 4% pour l'imagerie en fluorescence.

### **Hybridation *in situ* en fluorescence de molécules uniques (*smi*-FISH)**

L'approche d'hybridation *in situ* en fluorescence de molécules uniques (single molecule *inexpensive* FISH) utilisée dans cette étude est décrite par Tsanov, Nikolay, et al (2016).

#### Préparation des sondes

Pour l'expérience, 48 sondes primaires ciblant l'ARNm STAT3 et 43 autres ciblant l'ARNm JAK1 ont été générées avec le script Oligostan de Tsanov, Nikolay, et al (tableau III).

À chacune d'elles a été ajoutée en 3' la même séquence FLAP TTCACTCGGACCTCGTCGACATGCAT sur laquelle peut s'hybrider une sonde secondaire fluorescente qui lui est complémentaire. La sonde secondaire est conjuguée à deux molécules Cy3. Les sondes primaires, dont la concentration est de 100  $\mu$ M, ont été synthétisées dans une plaque de 96 puits par la compagnie IDT (Integrated DNA Technologies). À partir des puits, un mélange équimolaire de sondes primaires a été préparé dans un tampon TE où chacune est concentrée à 0,833  $\mu$ M.

#### Marquage des sondes primaires

Dans un tampon NEB 3, un volume de 2  $\mu$ l du mélange de sondes primaires a été ajouté à 1  $\mu$ l de la sonde secondaire fluorescente concentrée à 100  $\mu$ M (IDT). L'hybridation des sondes primaires à la sonde secondaire marquée Cy3 via le FLAP a été effectuée selon le programme thermique suivant : une incubation initiale à 85°C de 3 min, suivie d'une incubation à 65°C de 3 min, suivie d'une incubation à 25°C de 5 min.

#### smi-FISH

Les lignées CHC, étalées sur les lamelles de verre, ont été fixées à la paraformaldéhyde 4% durant 20 min. Ensuite, elles ont été perméabilisées à -20°C avec de l'éthanol 70% pendant 1 heure. Puis, elles ont été réhydratées à l'aide d'une solution à 15% formamide /1XSSC et incubées avec la solution d'hybridation toute la nuit à 37°C. Le mélange d'hybridation préparé comprend les sondes marquées au préalable, 20  $\mu$ g/ $\mu$ l d'ARNt *E.coli*, 20 mg/mL de BSA, 200 mM de VRC, 40% de dextran sulphate, 20X SSC et 100% de formamide. Après l'hybridation, les lamelles ont été lavées deux fois à 37°C avec une solution à 15% formamide /1XSSC. Finalement, pour l'observation au microscope, les lamelles ont été montées sur des lames en utilisant le milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories) contenant du DAPI.

**Tableau III.** Séquences des sondes primaires et le FLAP

<b>Numéro de la sonde</b>	<b>Sonde primaire + FLAP</b>
<b><i>Stat3_1</i></b>	TGTGTCAAGCTGCTGTAGCTGATTCCATTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_2</i></b>	CGCAGCTCCATTGGGAAGCTGTCACCTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_3</i></b>	ATTCTTTGCTGGCCGCATATGCCCAATTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_4</i></b>	CAGGAAGCGGCTATACTGCTGGTCAATCTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_5</i></b>	CACAATCCGGGCAATCTCCATTGGCTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_6</i></b>	TTTCATTGAGATCTTGCATGTCTCCTTGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_7</i></b>	CATCTGGTCCAGCGCAGTGAGCATCTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_8</i></b>	AGCTCCTCGTCCGTGAGAGTTTTCTGCTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_9</i></b>	ATGACGTTATCCAGTTTTCTAGCCGATCTAGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_10</i></b>	ATTTGTTGACGGGTCTGAAGTTGAGATTCTGCTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_11</i></b>	TAAGTTTCTAAACAGCTCCACGATTCTCTCCTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_12</i></b>	TGCCGCTCCACCACAAAGGCACTTTTTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_13</i></b>	ACCTGACTTTAGTAGTGAAGTGGACGCCGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_14</i></b>	TGAATTCTGCAGAGAGGCTGCCGTTGTTGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_15</i></b>	TCAGGGAAGCATCACAATTGGCTCGGCTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_16</i></b>	AGGTGATCAGGTGCAGCTCCTCAGTCTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_17</i></b>	TGGCAAGGAGTGGGTCTCTAGGTCAATCTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_18</i></b>	AGTTTACATTCTTGGGATTGTTGGTCAGCATGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_19</i></b>	CTCGGCCACTTGATCCCAGGTTCCAATTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_20</i></b>	CTCTGCCAGTGTAGTCAGCTGCTCGATTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_21</i></b>	TGTACCCTTCGTTCCAAAGGGCCAGGATTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_22</i></b>	CTCCTTCTTTGCTGCTTTCAGTGAATCTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_23</i></b>	GTGGAGACACCAGGATATTGGTAGCATCCTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_24</i></b>	CAGATAAACTTGGTCTTCAGGTATGGGGCAGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_25</i></b>	TCAGTCGTATCTTTCTGCAGCTTCCGTTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b><i>Stat3_26</i></b>	GTTAGTAGTTTCAGATGATCTGGGGTTTGGCTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT



<b>Stat3_27</b>	ACATCGGCAGGTCAATGGTATTGCTGCTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_28</b>	CTGGCCGACAATACTTTCCGAATGCCTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_29</b>	ACCACAGGATGGACGCCCAGGCATTTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_30</b>	CTGCTGAGGGTTCAGCACCTTCACCATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_31</b>	TTTGTGTATGGTTCCACGGACTGGATCTGGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_32</b>	CGCTGATGTCCTTCTCCACCCAAGTGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_33</b>	TCCCGCTCCTTACTGATAAAGCCCATTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_34</b>	CATCTCTGCTCCCTCAGGGTCAAGTGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_35</b>	TCCATGTTTCATCACTTTTGTGTTGTGCCCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_36</b>	TGTTAAATTTCCGGGATCCTCTGAGAGCTGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_37</b>	TTTGTAGGAACTTTTTGCTGCAACTCCTCTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_38</b>	CATCTTCTGCCTGGTCACTGACTGGTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_39</b>	TCATTTTCTGTTCTAGATCCTGCACTCTCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_40</b>	AACTCCATGTCAAAGGTGAGGGACTCAAACCTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_41</b>	TTTTCACAAGGTCAATGATATTGTCCAGCCAGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_42</b>	AGAAGGAGAAGCCCTTGCCAGCCATGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_43</b>	GTCCCCAGAGTCTTTGTCAATGCACACTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_44</b>	AGCTGATAATTCAACTCAGGGAATTGACCAGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_45</b>	CGGGCCTCCAATGCAGGCAATCTGTTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_46</b>	TGAAATCAAAGTCATCCTGGAGATTCTCTACCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_47</b>	GTAGATTGTGCTGATAGAGAACATTCGACTCTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Stat3_48</b>	CTTTGCAAAATTTAGCCCATGTGATCTGACACTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCAT
<b>Jak1_1</b>	GTGGTATTTCAGACTGGTTGCATACAGCATTCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b>Jak1_2</b>	ATTTAAATGGCAACTTCATTGCTGCCACTGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b>Jak1_3</b>	CTAGCCAGATGAAATGGTGGTATATTCTTTCCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b>Jak1_4</b>	AAACCGAAGTCTCCAATTTTCACTTGGTGTCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b>Jak1_5</b>	TCAACAAGGACATTTCTTGCTGCCAAGTCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b>Jak1_6</b>	GCTTCAGAGATTTAACAGCCACCTGCTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b>Jak1_7</b>	GAGGTCAGCCAGCTCCTTACATGATGGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b>Jak1_8</b>	ACTGGCCTGCACCGGCTTTCATAGAATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT

<b><i>Jak1_9</i></b>	TCGCCATTGTAGCAGATTTCCCAGAGCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_10</i></b>	TTCCAAAGCTCCACTTGTGACGAGCCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_11</i></b>	GCAATCCATGGGATTCGTTCAATGCATTCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_12</i></b>	CTAGACAGCACCGTAATGGGGATGCCGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_13</i></b>	CACTGAGCTTGATGAATGGGCCACACTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_14</i></b>	CAAACCTCTTCCACCATGATATTCTCCACGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_15</i></b>	TCGAAACTCAGCTGGCTCATGGGGTAGATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_16</i></b>	GCAGCAGCGTTTTAGCATGAAGCTGATGTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_17</i></b>	ACCTCGATCTGAAAGTTCTTGAAGTGCTTCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_18</i></b>	CCTGCACCTGCTCAGACTTCTCAAAGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_19</i></b>	ATGGCGTATTCTGTACAGATTGGACCATGATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_20</i></b>	ACGTCGGTGCAGAGGTAATGATGGGCATCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_21</i></b>	CATGCGTGGACACGCTGCTGTCACAATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_22</i></b>	AGACACTCGTTCTCAATATCATGTCCATCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_23</i></b>	TAGTGCCTCTAGCCGGGTCTTTCAAGTGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_24</i></b>	GATTGGATGGTTGGAATCCCAGCATTTCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_25</i></b>	CTTGTGACTGTCATCTGGCCATGGGTGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_26</i></b>	CTGTCCCGGTCATCCTTGACGGTGTAATTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_27</i></b>	TCTTTCTCAATCAGCGTCTTGTCTTTCAAGGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_28</i></b>	CACATTTCCATGGACCAGGTCTTTATCCTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_29</i></b>	TTTCCATGGTGTGGTAAGGACATCGCTTTTCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_30</i></b>	GTGCGCAGGATCTGCTTCTTGAGGTGGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_31</i></b>	TGACGGTCATGAGGATGTTGTCAAAGTCGGTGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_32</i></b>	GAAGGTTCTCTGTCTGATGGACTTATTCAATTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_33</i></b>	TCGGTCTTGGGGTCTCGAATAGGAGCCATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_34</i></b>	TCTGCTTCTTTGGAGAATGACGCCACACTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_35</i></b>	GACATCTTGTGTCATCAACGGTGATGGTGCGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_36</i></b>	CCTGATGCACAGTTCTCTGCTGTGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_37</i></b>	TCCTCGCTTCTTCTTGCCGCAATTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_38</i></b>	GCCTCCAGGTTACCTCAGTCTTCTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT

<b><i>Jak1_39</i></b>	CTGCCACTCCTGGGCTTTCTTAGTAGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_40</i></b>	CCCTGCACCAGATCCTTCTTGAGGATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_41</i></b>	CTCCTCATTTTAGCACAGAAAGCCATGGCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_42</i></b>	CAGCAGGTTGGAGATTCTCGGGGCTTGGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
<b><i>Jak1_43</i></b>	CCCAGAATAGATGTGTGTTCTCGTGCCTCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT

## Imagerie par microscopie en fluorescence et analyse

L'acquisition des *stacks* d'images a été faite à l'aide du microscope droit Zeiss avec l'objectif 63x/1.4 Plan Apochromat et la caméra CMOS Prime BSI Scientific. Les fluorophores GFP et Cy3 ont été excités avec la source lumineuse X-Cite Exacte Lamp et ce, durant 150 ms et 300 ms respectivement. L'analyse a été faite avec le logiciel *Fiji* sur des images 2D, obtenues en effectuant une projection d'intensité maximale sur les *stacks* d'images capturés dans le canal GFP. Les régions qui constituent les protrusions ont été délimitées des régions qui constituent les corps cellulaires en utilisant la technique du « *thresholding* ». Mais avant cela, «le bruit de fond» a d'abord été réduit de chaque image en utilisant l'algorithme « *Rolling ball* ». Cet algorithme détermine une valeur moyenne d'arrière-plan autour de chaque pixel et la soustrait de l'image d'origine. Ensuite, sur chaque image corrigée, le seuil d'intensité du signal  $\alpha$ -actinine-GFP a été ajusté de manière à obtenir une image binaire où les régions des protrusions sont segmentées des corps cellulaires. Enfin, à l'aide de l'outil de sélection «polygone», la région de chaque protrusion a été tracée manuellement et sa surface a été mesurée. Le même procédé a été utilisé pour analyser le corps cellulaire.

Quant à la quantification des molécules uniques ou *spots* d'ARNm STAT3 et JAK1, elle a été faite à l'aide du module d'extension *Spot Detector* du logiciel ICY. L'algorithme *Undecimated Wavelet Transform* a été utilisé, car il est conçu pour détecter les *spots*, même si le bruit de fond de l'image est élevé. L'échelle 2 a été choisie pour détecter uniquement les *spots* dont le diamètre se situe entre 4 à 7 pixels. Au cours du processus de détection, un « *threshold* » ou *Wavelet Adaptive Threshold* est calculé, puis appliqué sur les images originales afin d'éliminer le bruit de fond. Pour améliorer la sensibilité de détection des *spots* correspondants aux ARNm STAT3 et JAK1, la valeur du « *threshold* » a été ajustée. Les *spots* localisés à la

protrusion ont été détectés à l'intérieur d'une ROI ( *Region Of Interest*), tracée selon la segmentation obtenue avec *Fiji*. Les *spots* localisés au corps cellulaire ont été détectés de la même manière.

## **Quantification de l'enrichissement des ARNm STAT3 et JAK1 aux protrusions**

La quantification de l'enrichissement des ARNm STAT3 et JAK1 au niveau des protrusions a été calculée de trois manières. Premièrement, sur la population totale exprimée par cellule, le pourcentage de molécules uniques de l'ARNm localisées dans la protrusion a été calculé en divisant le nombre de molécules uniques de l'ARNm localisées dans la protrusion par le nombre total de molécules exprimées par cellule. Le résultat a ensuite été transformé en pourcentage. Le même calcul a été fait pour le corps cellulaire. Deuxièmement, le rapport du nombre de molécules uniques localisées dans la protrusion sur le nombre de molécules uniques localisées dans le corps cellulaire a été calculé en divisant le nombre de molécules uniques de l'ARNm localisées dans la protrusion par le nombre de molécules uniques de l'ARNm localisées dans le corps cellulaire. Troisièmement, la distribution des molécules de l'ARNm relativement à la taille de la protrusion a été calculée en divisant le nombre de molécules uniques de l'ARNm localisées dans la protrusion par la taille de celle-ci, ce qui permet d'obtenir la densité par unité de surface. Le même calcul a été fait pour le corps cellulaire.

## **Statistiques**

Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant la version 8 de GraphPad Prism. Le test statistique One-way ANOVA, suivi du test statistique de comparaison multiple de Tukey ont été utilisés pour comparer les phénotypes observés entre les trois lignées CHC. Finalement, le test Student a été utilisé pour comparer entre le groupe de lignées CHC déplétées avec shRNA STAT3 et le groupe contrôle shRNA scramble. Une valeur p de moins de 0.05 indique une différence statistiquement significative.

## Résultats

L'objectif principal consiste à valider l'enrichissement de l'ARNm STAT3 dans les protrusions des cellules métastatiques du carcinome hépatocellulaire (CHC) par *smiFISH*. Puisque ce projet est essentiellement basé sur la microscopie, nous devons donc commencer par trouver des méthodes expérimentales qui pouvaient nous permettre de générer et localiser les protrusions dans les cellules CHC et qui soient compatibles avec la technique du *smiFISH*.

Dans cette étude, nous avons utilisé la lignée du carcinome hépatocellulaire HCCLM3 qui possède un phénotype métastatique. Comme comparatif et à titre de contrôle positif, nous avons utilisé une seconde lignée métastatique appelée MHCC97H. Finalement, nous avons utilisé la lignée cancéreuse non-métastatique SMMC7721 qui nous a servi de contrôle négatif.

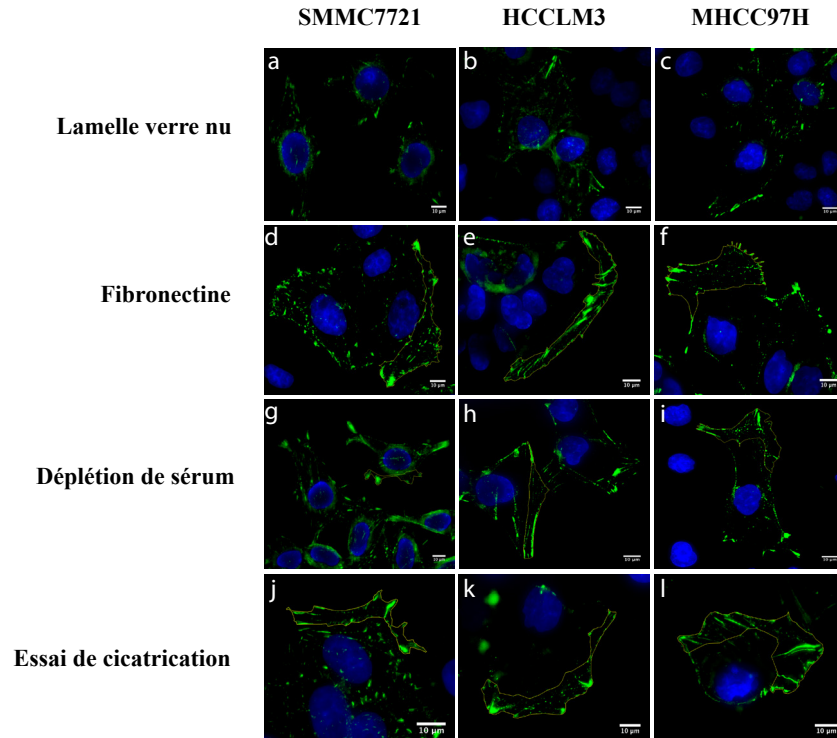
### L'essai de déplétion de sérum génère le plus grand nombre de cellules CHC protrusives

Il est connu que lors de la migration cellulaire, l' $\alpha$ -actinine s'accumule au niveau des adhésions focales qui se forment à la jonction du lamella et le lamellipode, soit la région cellulaire qui délimite le front de migration. Pour localiser la protrusion, nous avons donc procédé à l'expression de la protéine de fusion  $\alpha$ -actinine-GFP à la fois dans les cellules non-métastatiques SMMC7721 et les cellules métastatiques (HCCLM3 et MHCC97H) par infection au lentivirus pHAGE-EF1a- $\alpha$ -actinine-GFP-IRES-hygro. Pour induire la formation de protrusions chez les lignées CHC, nous avons réalisé plusieurs essais communément utilisés pour la stimulation de la migration cellulaire en 2D : le test d'adhérence à la fibronectine, l'essai de déplétion de sérum et l'essai de cicatrisation. Nous avons par la suite déterminé l'efficacité de ces essais en comparant le nombre de cellules CHC protrusives générées avec celui des cellules CHC étalées sur des lamelles de verre nu et utilisées comme contrôle négatif de l'induction de la migration dans cette expérience.

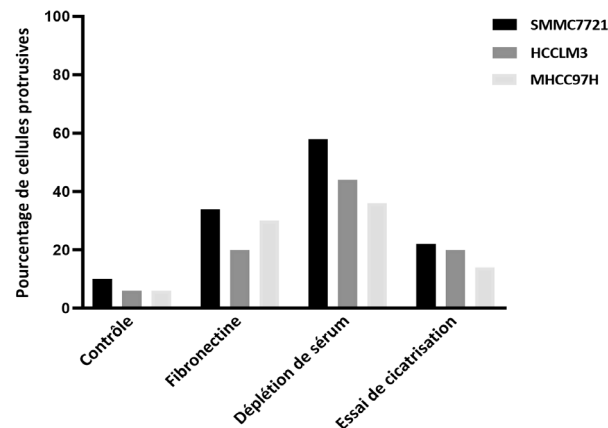
La figure 7.A montre des images représentant la localisation spatiale de l' $\alpha$ -actinine-GFP des différentes lignées cellulaires CHC après induction de la migration. Tel qu'attendu, la plupart des cellules CHC étalées sur des lamelles de verre nu ne montrent pas de localisation de l' $\alpha$ -actinine-GFP au front de migration (a,b,c). Toutefois, chez environ 10% d'entre elles, nous

avons observé la formation de protrusions en raison de leur adhérence à la surface de verre nu (Figure 7.B). Comparativement, dans tous les essais effectués, celui d'adhérence à la fibronectine (d,e,f), de déplétion de sérum (g,h,i) et de cicatrisation (j,k,l), nous avons observé une accumulation importante de l' $\alpha$ -actinine-GFP au front de migration (figure 7.A) des cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H. Cette localisation apparente indique que ces cellules forment bel et bien des protrusions. Plus encore, dans tous ces essais, le nombre de cellules protrusives observé est nettement supérieur à celui généré dans l'essai contrôle. En effet, sur une population considérée de 100 cellules, le pourcentage de cellules CHC protrusives générées se situait entre 20 et 30% pour l'essai de cicatrisation, entre 20 et 40% pour le test d'adhérence à la fibronectine et entre 40 et 60% pour l'essai de déplétion de sérum (Figure 7.B). Ces résultats révèlent que l'essai de déplétion de sérum est celui qui permet de générer le plus grand nombre de cellules CHC protrusives. Pour continuer cette étude, nous nous appuierons sur cet essai qui nous permettra également de corroborer les résultats trouvés par nos collaborateurs, puisqu'il reproduit la migration chimiotactique aussi utilisée dans la technique de la chambre modifiée de Boyden.

**A**



**B**



**Figure 7. Différents essais d'induction de la migration cellulaire des lignées CHC sur lamelle de verre.** (A) Visualisation par fluorescence de la localisation spatiale de l' $\alpha$ -actinine-GFP dans les cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H. Les lignées CHC ont été infectées au lentivirus pHAGE-EF1a- $\alpha$ -actinine-GFP-IRES-hygro, triées au FACS, cultivées, puis étalées sur des lamelles de verre aux surfaces nues (contrôle : a,b,c) ou recouvertes avec 10  $\mu$ g/ $\mu$ l de fibronectine (d,e,f). Dans l'essai de déplétion de sérum (g,h,i), les cellules ont été incubées en absence de sérum, puis réintroduites en sa présence 24h plus tard. Dans l'essai de cicatrisation (j,k,l), une plaie a été induite sur une monocouche cellulaire et pour la refermer, les cellules ont été laissées incuber et migrer durant 24 à 48h. Le vert représente le marquage GFP de l' $\alpha$ -actinine et il est superposé au bleu, qui représente la marquage du noyau au DAPI. Barre d'échelle : 10 $\mu$ m. (B) Quantification du pourcentage de cellules protrusives SMMC7721 (noir), HCCLM3 (gris foncé) et MHCC97H (gris pâle) générées dans chaque essai (n= 100 cellules).

**Dans l'essai de déplétion, les protrusions formées par les cellules CHC métastatiques sont de taille similaire à celles formées par les cellules CHC non-métastatiques .**

Lors de la migration, la taille des protrusions formées peut varier d'une lignée CHC à une autre. Pour quantifier la distribution des molécules d'ARNm STAT3 relativement à la taille des protrusions, il a fallu d'abord mesurer et comparer leur surface. Puisque les ARNm ont la capacité de diffuser dans le cytoplasme, il est plus probable de les voir se localiser dans les protrusions si la taille de ces dernières est grande. En effet, on peut envisager que lorsque l'environnement intracellulaire est moins restreint, le trafic des ARNm est facilité et cela peut fausser l'interprétation que l'on pourrait faire de l'enrichissement de l'ARNm STAT3. Pour effectuer la même analyse, nous avons également mesuré et comparé les surfaces des corps cellulaires des trois lignées CHC.

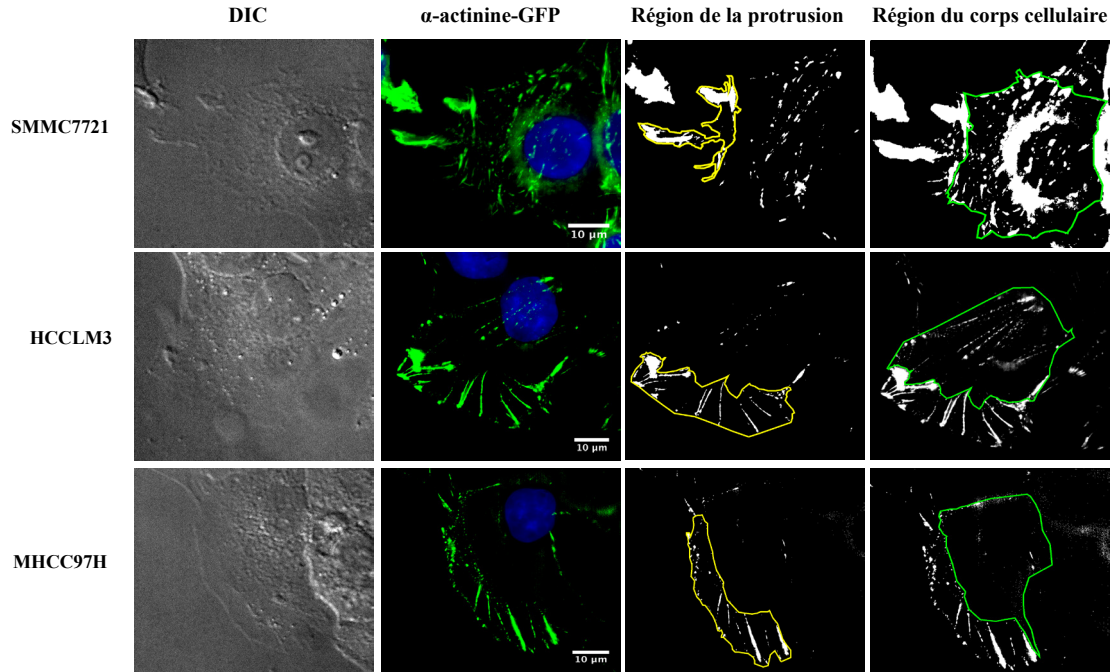
La figure 8.A montre des images représentant l'accumulation de l' $\alpha$ -actinine-GFP aux protrusions des cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H dans l'essai de déplétion de sérum. Nous avons réalisé les mesures des surfaces à l'aide du logiciel Fiji sur des images 2D, obtenues en effectuant une projection d'intensité maximale sur les *stacks* d'images capturés dans le canal GFP. Nous avons réduit le signal « bruit de fond » de chaque image. Puis, nous avons procédé à la segmentation de la protrusion en ajustant le seuil d'intensité du signal  $\alpha$ -actinine-GFP, et ce, de manière à ne pouvoir distinguer que sa morphologie. Ensuite, nous avons sélectionné manuellement la région protrusive segmentée (voir figure 8.A : contour jaune) et nous avons mesuré sa surface. De la même façon, nous avons mesuré la surface du reste de la cellule, appelée dans cette étude le corps cellulaire (voir figure 8.A : contour vert). Ainsi, nous avons délimité la protrusion et le corps cellulaire, de manière à reproduire la séparation qui a été fait avec la chambre modifiée de Boyden de ces deux compartiments.

Les protrusions mesurent en moyenne  $350 \mu\text{m}^2 (\pm 177)$  pour les cellules SMMC7721,  $400 \mu\text{m}^2 (\pm 130)$  pour les cellules HCCLM3 et  $445 \mu\text{m}^2 (\pm 193)$  pour les cellules MHCC97H (voir figure 2.B). Quant aux corps cellulaires, ils ont une surface moyenne de  $1062 \mu\text{m}^2 (\pm 234)$  pour les cellules SMMC7721, de  $1090 \mu\text{m}^2 (\pm 409)$  pour les cellules HCCLM3 et de  $1320 \mu\text{m}^2 (\pm 270)$  pour les cellules MHCC97H. La comparaison de ces résultats montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les mesures des surfaces des protrusions formées par les

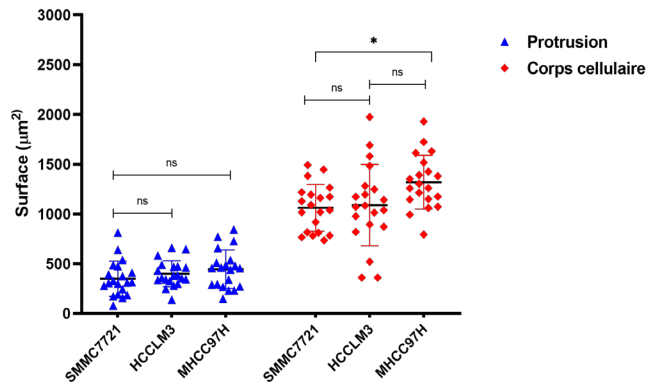


cellules métastatiques HCCLM3 et MHCC97H et celles formées par les cellules non-métastatiques SMMC7721. De même, il n'y a pas de différence significative entre les mesures de surfaces des corps cellulaires des cellules métastatiques HCCLM3 et celles des cellules non-métastatiques SMMC7721 (figure 8.B). Toutefois, les corps cellulaires formés par les cellules MHCC97H sont de taille plus grande que ceux formés par les cellules SMMC7721 (figure 8.B ,  $P < 0.05$ ). Par ailleurs, en comparant les mesures de surfaces des protrusions et des corps cellulaires des lignées métastatiques entre elles, nous n'avons observé aucune différence significative (figure 8.B). Il faut également noter que les trois lignées CHC forment des protrusions dont la surface est nettement inférieure à celle de leurs corps cellulaires. En résumé, ces résultats suggèrent que, lorsqu'elles migrent sur une surface 2D, les cellules métastatiques HCCLM3 et MHCC97H ne forment pas des protrusions de taille différente à celle des cellules non-métastatiques SMMC721.

**A**



**B**



**Figure 8. Mesures des surfaces des protrusions et des corps cellulaires formés par les lignées CHC étalées sur lamelle de verre.** (A) Images représentant l'accumulation de l' $\alpha$ -actinine-GFP aux protrusions des cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H dans l'essai de déplétion de sérum. Le gris représente l'image en contraste interférentiel différentiel (DIC). Le vert représente le marquage GFP de l' $\alpha$ -actinine et il est superposé au bleu, qui représente le marquage du noyau au DAPI. Barre d'échelle : 10 $\mu$ m. À la troisième colonne figurent des images représentant la segmentation de la région protrusive réalisée avec le logiciel Fiji et tracée manuellement (contour jaune). Le contour vert, tracé aussi manuellement, délimite le reste de la cellule, représentant le corps cellulaire. (B) Mesures des surfaces ( $\mu$ m<sup>2</sup>) des protrusions (bleu) et des corps cellulaires (rouge) formés par les cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H (n= 20 cellules) sur les lamelles de verre. Les données des trois lignées ont été comparées entre elles en appliquant le test One way ANOVA, suivi du test de Tukey (ns : non-significatif  $P > 0.05$  ; \*:  $P \leq 0.05$ ).

**Le smiFISH révèle que l'expression des transcrits STAT3 et JAK1 est moins élevée dans les cellules CHC métastatiques que dans les cellules HCC non-métastatiques.**

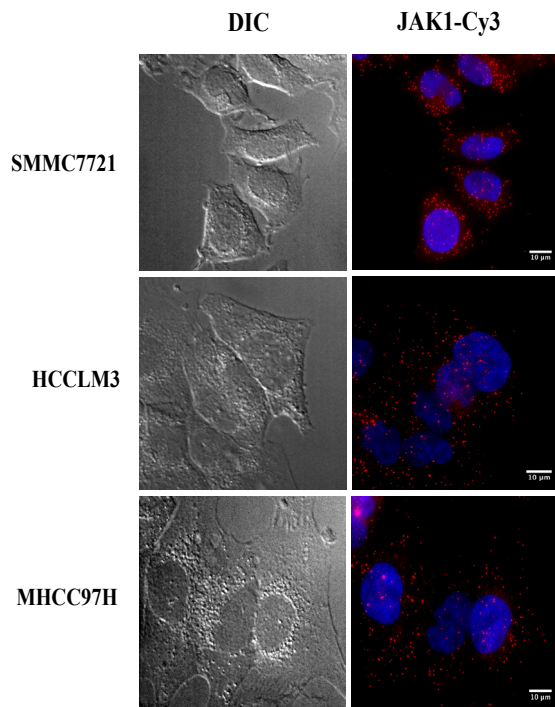
Pour confirmer que le transcrit STAT3 est bel et bien enrichi au niveau des protrusions des cellules CHC associées à un phénotype métastatique par *smiFISH*, il fallait que nous quantifions et que nous comparons son profil de localisation à celui d'un ARNm, listé comme étant non enrichi dans les données d'ARN-Seq obtenues par nos collaborateurs de Chine (Liu et al., 2016). Pour faire cette expérience contrôle, nous avons choisi l'ARNm qui encode pour JAK1 car, dans les lignées CHC, son niveau d'expression est comparable à celui du transcrit STAT3 (résultats non présentés). L'ARNm JAK1 est donc suffisamment exprimé pour être détecté par *smiFISH* et facilement quantifié.

Pour localiser les transcrits STAT3 et JAK1, nous avons utilisé la technique du *smiFISH* en procédant comme suit: à l'aide du script *OligoStan*, nous avons généré 48 sondes primaires spécifiques à l'ARNm STAT3 et 43 sondes spécifiques à l'ARNm JAK1 et nous les avons pré-hybridées à une sonde secondaire FLAP couplée à deux molécules de Cy3. Ensuite, nous avons réalisé les expériences d'hybridation *in situ* en fluorescence sur les différentes lignées CHC et nous avons visualisé le signal Cy3, qui indique la présence de molécules d'ARNm uniques. La figure 9 (A et B) montre des images représentant la localisation spatiale des ARNm STAT3 et JAK1 dans les cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H ayant été soumises à l'essai de déplétion de sérum. Au premier abord, leur distribution paraît être uniforme et aléatoire au sein de la cellule.

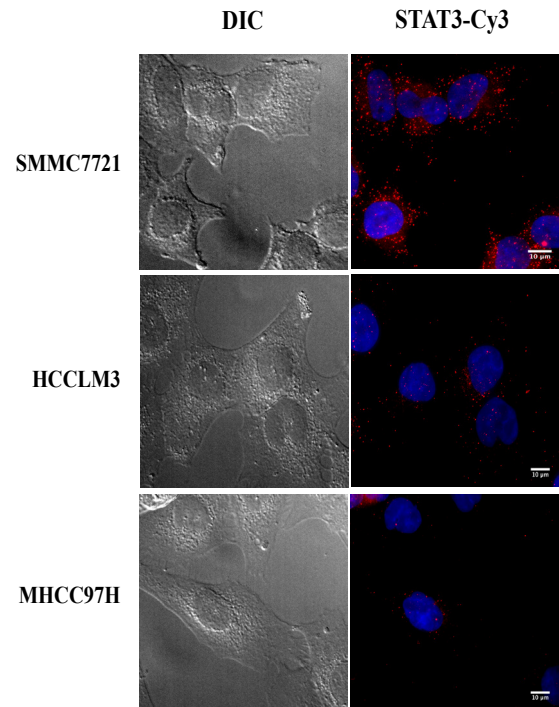
Ensuite, à l'aide du logiciel ICY, nous avons quantifié les molécules d'ARNm uniques de STAT3 et JAK1 exprimées par cellule (figure 9.C). Le nombre de molécules uniques / cellule dans la lignée SMMC7721 est en moyenne de 95 ( $\pm$  19) pour l'ARNm STAT3 et de 75 ( $\pm$  17) pour l'ARNm JAK1, alors que dans la lignée HCCLM3, il est en moyenne de 29 ( $\pm$  12) pour l'ARNm STAT3 et de 48 ( $\pm$  15) pour l'ARNm JAK1. Pour la lignée MHCC97H, il est en moyenne de 22 ( $\pm$  11) pour l'ARNm STAT3 et de 50 ( $\pm$  16) pour l'ARNm JAK1. Ces quantifications révèlent qu'il existe une différence très significative ( $P < 0.001$ ) entre le niveau d'expression des ARNm STAT3 et JAK1 de la lignée non-métastatique et celui des lignées métastatiques (figure 9.C). Ces résultats suggèrent que les cellules du carcinome

hépatocellulaire qui acquièrent un phénotype métastatique expriment significativement moins les transcrits STAT3 et JAK1. Cette diminution d'expression est observée à la fois dans les cellules HCCLM3 et dans les cellules MHCC97H, et elle est beaucoup plus importante pour l'ARNm STAT3 que pour l'ARNm JAK1 (figure 9). En fait, les niveaux d'expression de l'ARNm STAT3 sont trois à quatre fois moins importants dans les cellules HCCLM3 et MHCC97H que dans les cellules SMMC7721. D'ailleurs, nos résultats obtenus par *smiFISH* corrélaient avec les mesures d'expression relative de l'ARNm STAT3 faites par RT-qPCR dans les trois lignées CHC WT. La quantification par RT-qPCR montre que les cellules métastatiques expriment environ trois fois moins le transcrit STAT3 ( $P < 0.0001$ ) (figure 9.D). La comparaison des niveaux d'expression des transcrits STAT3 et JAK1 entre les différentes lignées CHC n'a pas été analysée par nos collaborateurs. Notre quantification absolue des molécules *smiFISH* nous a donc permis d'obtenir un résultat inattendu, mais nouveau.

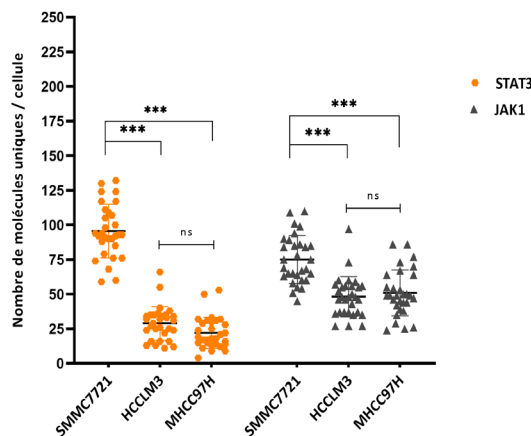
**A**



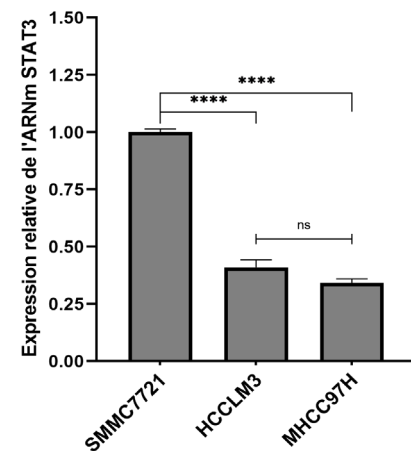
**B**



**C**



**D**



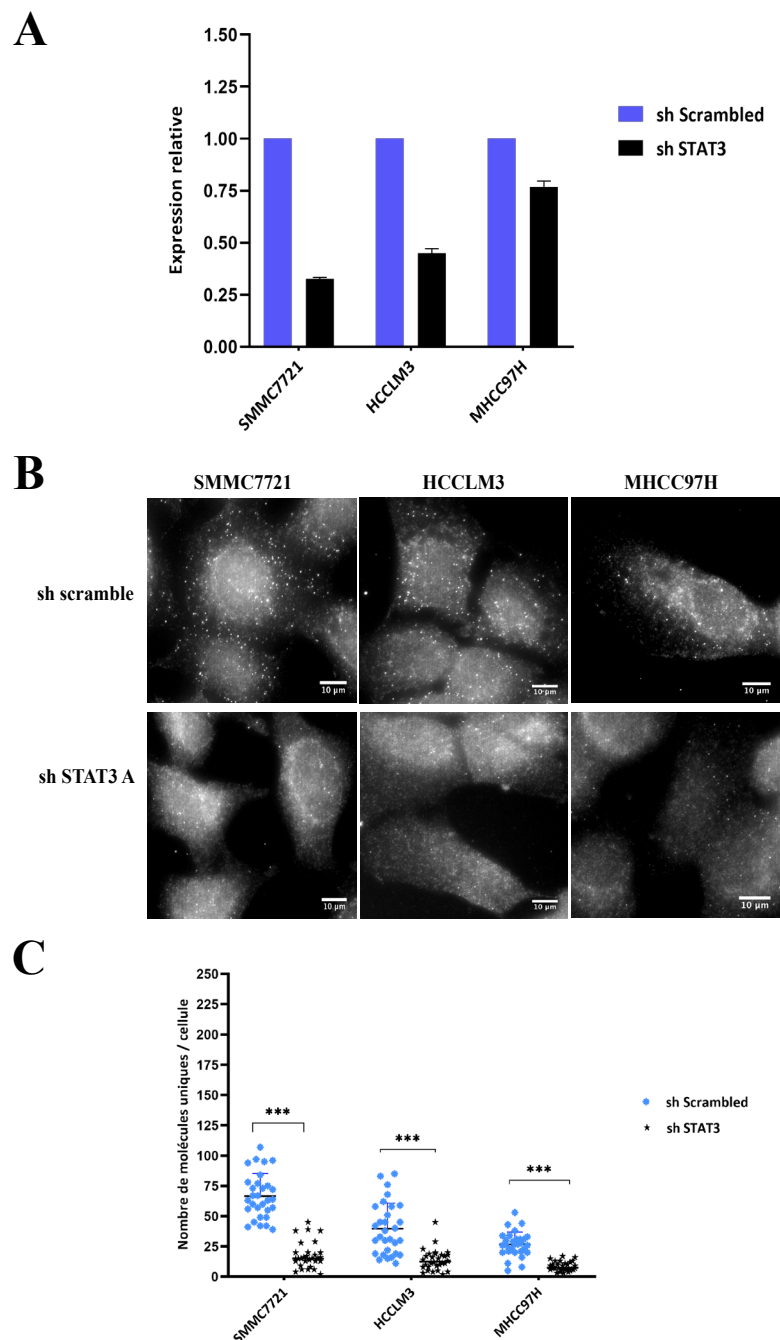
**Figure 9. Détection des ARNm STAT3 et JAK1 par smiFISH dans les lignées CHC.** (A) et (B) Images représentant le marquage des ARNm STAT3 et JAK1 dans les cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H qui ont été soumises à l'essai de déplétion de sérum. 48 sondes primaires spécifiques à l'ARNm STAT3 et 43 sondes primaires spécifiques à l'ARNm JAK1 ont été pré-hybridées à une sonde secondaire FLAP (couplée à deux molécules de Cy3), puis utilisées pour le marquage smiFISH. Le gris représente l'image en contraste interférentiel différentiel (DIC). Le rouge représente le marquage Cy3 des transcrits JAK1 et STAT3 et il est superposé au bleu, qui représente le marquage du noyau au DAPI. Barre d'échelle : 10μm. (C) Nombre de molécules d'ARNm uniques de STAT3 et JAK1 exprimées par cellule quantifié à l'aide du logiciel ICY (n = 30 cellules ). (D) RT-qPCR: quantification relative des niveaux d'expression de l'ARNm STAT3 dans les lignées CHC WT. Les données des trois lignées ont été comparées entre elles en appliquant le test One way ANOVA, suivi du test de Tukey (ns : non-significatif ;  $P > 0.05$  ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$  et \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ).

### **Les sondes *smiFISH* ciblant l'ARNm STAT3 sont spécifiques**

Pour démontrer que les sondes *smiFISH* ciblent spécifiquement l'ARNm STAT3, nous avons déplété son expression dans les cellules CHC en utilisant l'interférence par shRNA. Puis, nous avons quantifié la perte d'expression qui en a résulté à la fois par RT-qPCR et par quantification des molécules uniques *smiFISH*. En parallèle, nous avons réalisé une expérience qui nous a servi de contrôle négatif de la déplétion en utilisant un shRNA scramble qui ne cible pas l'ARNm STAT3.

La figure 10.A montre les variations de l'expression relative de l'ARNm STAT3 quantifiée par RT-qPCR dans les cellules CHC déplétées par shRNA STAT3 A et celles déplétées par shRNA scramble. Comparativement aux cellules CHC déplétées par le shRNA scramble, celles qui sont déplétées par le shRNA STAT3 A expriment l'ARNm STAT3 à des niveaux plus réduits. Le niveau d'expression a baissé de 70% chez les cellules SMMC7721, d'un peu plus de 50% chez les cellules HCCLM3 et de 25% chez les cellules MHCC97H. Contrairement à la lignée non métastatique, les lignées métastatiques ont un taux de déplétion qui semble, à première vue, ne pas être optimal puisqu'il est moins important.. Mais comme, à la base, les lignées métastatiques expriment de faibles niveaux d'ARNm STAT3 (Figure 9), il est manifestement plus contraignant de les réduire davantage sans provoquer la mort des cellules. En effet, l'utilisation de fortes concentrations de shRNA peut affecter les gènes de survie et induire la mort des cellules (Putzbach et al., 2017). Néanmoins, la déplétion de l'ARNm STAT3 a été suffisamment importante pour nous permettre d'observer et de quantifier une perte évidente du signal par *smiFISH* (Figures 10.B et 10.C). Ainsi, avec le shRNA scramble, le nombre de molécules de l'ARNm STAT3 détecté par cellule est en moyenne de 67 ( $\pm$  19) pour les cellules SMMC7721, de 39 ( $\pm$  21) pour les cellules HCCLM3 et de 26 ( $\pm$  10) pour les cellules MHCC97H. Avec le shRNA STAT3 A, le nombre de molécules de l'ARNm STAT3 détecté par cellule est fortement réduit et il est en moyenne de 17 ( $\pm$  10) pour les cellules SMMC7721, de 13 ( $\pm$  9) pour les cellules HCCLM3 et de 9 ( $\pm$  4) pour les cellules MHCC97H. Cette baisse du nombre de molécules d'ARNm STAT3 exprimées dans les cellules déplétées par shRNA STAT3 A est statistiquement très significative ( $P < 0.001$ ) (Figure 10.C). Ensemble, ces résultats confirment que les sondes sont spécifiques à l'ARNm

STAT3, car sa déplétion a entraîné une perte du signal *smiFISH* Cy3 et une forte baisse du nombre de molécules uniques détectées.



**Figure 10. Validation de la spécificité des sondes smiFISH ciblant l'ARNm STAT3.** (A) RT-qPCR: Quantification relative des niveaux d'expression de l'ARNm STAT3 dans les lignées CHC infectées avec le lentivirus shRNA scramble (contrôle négatif) et celles infectées avec le lentivirus shRNA STAT3 A. (B) Détection par smiFISH des molécules d'ARNm uniques (blanc) exprimées dans les lignées CHC déplétées par shRNA scramble et celles déplétées par shRNA STAT3 A. Barre d'échelle : 10μm. (C) Quantification du nombre de molécules d'ARNm STAT3 uniques exprimées dans les lignées CHC déplétées par shRNA scramble et celui des lignées CHC déplétées par shRNA STAT3 A (n = 30 cellules). Les données de déplétion avec le shRNA scramble ont été comparées avec celles de la déplétion avec le shRNA STAT3 A en appliquant un test de Student (\*\*\*) : P < 0.001).



### **L'ARNm STAT3 n'est pas enrichi au niveau des protrusions des cellules CHC associées à un phénotype métastatique**

Précédemment, nous avons déterminé que les protrusions et les corps cellulaires formés par les cellules métastatiques sont de taille similaire à ceux des cellules non-métastatiques (voir figure 8). Nous avons également déterminé que les cellules HCCLM3 et MHCC97H expriment beaucoup moins les transcrits STAT3 et JAK1 comparativement aux cellules SMMC7721 (voir figure 9). Par conséquent, nous avons validé l'enrichissement de l'ARNm STAT3 au niveau des protrusions des cellules CHC associées à un phénotype métastatique en considérant la variabilité des niveaux exprimés et en évaluant sa densité relativement aux surfaces des protrusions et des corps cellulaires.

Cette validation de l'enrichissement, nous l'avons faite de trois manières. Premièrement, sur la population totale exprimée par cellule, nous avons calculé le pourcentage de molécules uniques de l'ARNm STAT3 présentes dans la protrusion. Nous avons donc divisé le nombre de molécules uniques de l'ARNm localisées dans la protrusion par le nombre total de molécules exprimées par cellule. Le résultat a ensuite été transformé en pourcentage. Le même calcul a été fait pour le corps cellulaire. Deuxièmement, nous avons divisé le nombre de molécules uniques de l'ARNm STAT3 localisées dans la protrusion par le nombre de molécules uniques de l'ARNm STAT3 localisées dans le corps cellulaire obtenir le ratio de localisation Ps/C.c. Troisièmement, nous avons normalisé la distribution des molécules d'ARNm STAT3 relativement à la surface de la protrusion. Nous avons donc divisé le nombre de molécules uniques de l'ARNm STAT3 localisées dans la protrusion par la taille de celle-ci, ce qui a permis d'obtenir la densité par unité de surface. Nous avons procédé au même calcul pour le corps cellulaire. Aussi, nous avons procédé aux mêmes calculs pour JAK1, l'ARNm qui nous a servi de contrôle négatif de l'enrichissement aux protrusions cellulaires.

Les figures 11.A et 11.B montrent la localisation des ARNm STAT3 et JAK1 au niveau des protrusions des cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H dans l'essai de déplétion de sérum. Au niveau des protrusions des cellules métastatiques HCCLM3 et MHCC97H, on observe qu'il y a peu de localisation de ces transcrits. Par contre, aux protrusions des cellules SMMC7721, les deux ARNm localisent (figures 11.A et 11.B). La comparaison du pourcentage de molécules d'ARNm STAT3 et JAK1 localisant aux protrusions des cellules

SMMC7721 avec celui des cellules HCCLM3 et celui des cellules MHCC97H confirme ces observations (figures 12.A et 12.B). Sur la population totale exprimée par cellule, 15% des molécules d'ARNm JAK1 localisent dans les protrusions des cellules SMMC7721. Ce pourcentage est de 11% pour HCCLM3 et de 5% pour les cellules MHCC97H (figure 12.A). Le transcrit JAK1 localise moins dans les protrusions des cellules métastatiques (figure 12.A) et particulièrement dans les protrusions des cellules MHCC97H. En fait, sur la population totale exprimée par cellule, l'ARNm JAK1 localise principalement dans les corps cellulaires des cellules CHC, soit à 84% pour les cellules SMMC7721, à 89% pour les cellules HCCLM3 et à 95% pour les cellules MHCC97H. Et tel qu'attendu, nos résultats confirment ceux obtenus par nos collaborateurs, à savoir que le transcrit JAK1 est plus présent dans les corps cellulaires (valeur de RPKM de 51.93) que dans les protrusions (valeur de RPKM de 45.75) des cellules SMMC7721; et que le transcrit JAK1 est plus présent dans les corps cellulaires (valeur de RPKM de 24.38) que dans les protrusions (valeur de RPKM de 19.63) des cellules HCCLM3.

Le profil de localisation de l'ARNm STAT3 ne s'est pas avéré être différent de celui de JAK1 (figure 12.B), contrairement à ce qui était attendu. Sur la population totale exprimée par cellule, le pourcentage de molécules uniques d'ARNm STAT3 localisant dans les protrusions des cellules HCCLM3 (8%) et MHCC97H (7%) est significativement plus petit que celui des cellules SMMC7721 (15%). On en déduit qu'il n'y a pas d'enrichissement de ce transcrit dans les protrusions des cellules métastatiques. D'ailleurs, le transcrit STAT3 est plus présent dans les corps cellulaires des cellules métastatiques (à 92% pour HCCLM3 et à 93% pour MHCC97H) que dans ceux des cellules non-métastatiques (à 85%) (figure 12.D). Nos résultats obtenus pour la lignée métastatique HCCLM3 ne confirment pas ceux de nos collaborateurs qui ont estimé que l'ARNm STAT3 était plus présent dans les protrusions (valeur de RPKM de 47.91) que dans les corps cellulaires (valeur de RPKM de 23.04) (Tableau I).

En outre, le ratio du nombre de molécules d'ARNm STAT3 uniques localisées dans les protrusions sur le nombre de molécules uniques localisées dans les corps cellulaires (ratio  $P_s/C_c$ ) est nettement plus petit pour les cellules HCCLM3 et MHCC97H que pour les cellules SMMC7721. On en déduit que l'ARNm STAT3 n'est pas enrichi aux protrusions des cellules métastatiques. Ce résultat ne confirme pas celui de nos collaborateurs qui ont plutôt déterminé pour l'ARNm STAT3 un ratio  $RPKM_{P_s}/RPKM_{C_c}$  de 2.08 pour les cellules HCCLM3, valeur

nettement supérieure à celle trouvée pour les cellules SMMC7721, dont le ratio  $RPKM_{Ps}/RPKM_{C.c}$  est de 1.24 (Tableau I).

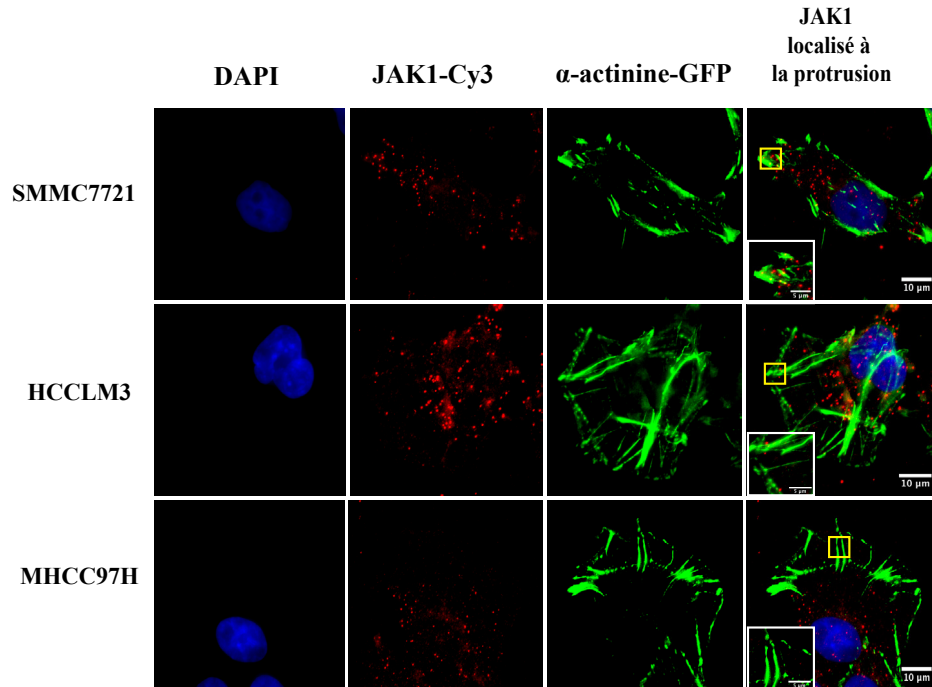
Quant à l'ARNm JAK1, le ratio Protrusion/Corps cellulaire des cellules SMMC7721 est significativement similaire à celui des cellules HCCLM3, mais par rapport à celui des cellules MHCC97H, il est plus grand. Encore une fois, nous confirmons les résultats préliminaires qui rapportent une absence d'enrichissement pour l'ARNm JAK1 aux protrusions des cellules métastatiques (Tableau I).

Pour ce qui est la densité de l'ARNm STAT3 / unité de surface dans les protrusions des cellules HCCLM3 et MHCC97H, elle est nettement inférieure à celle des cellules SMMC7721. On en déduit que l'ARNm STAT3 n'est pas enrichi aux protrusions des cellules métastatiques. Il en est de même pour l'ARNm JAK1. Aussi, la densité de l'ARNm STAT3 / unité de surface dans les corps cellulaires des cellules métastatiques est nettement inférieure à celle des cellules non-métastatiques. Toutefois, la densité de JAK1 / unité de surface des cellules non-métastatiques n'est pas différente de celle des cellules métastatiques.

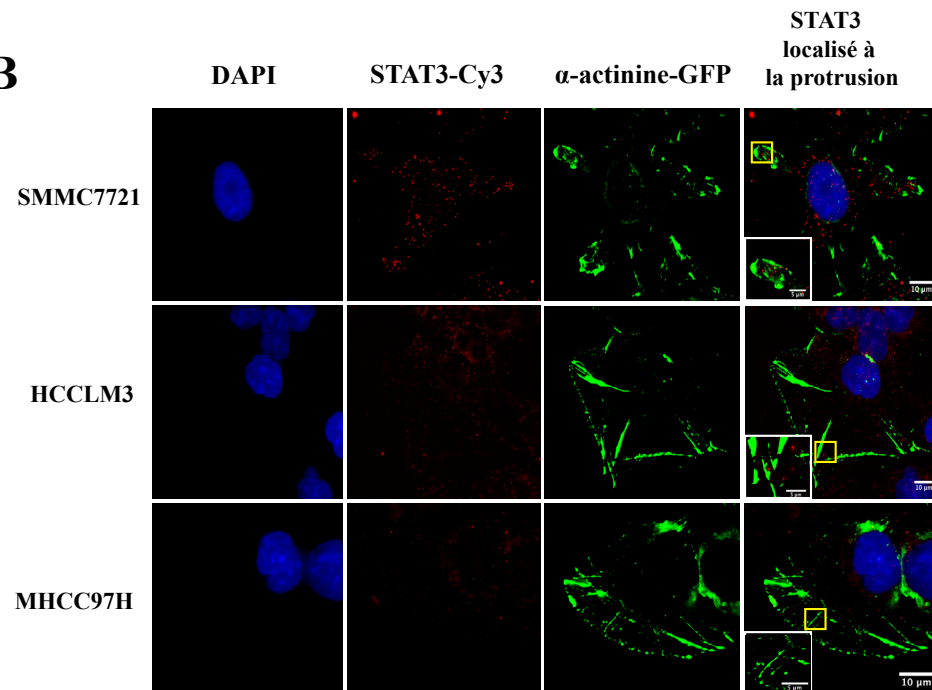
Notre évaluation de la localisation de l'ARNm STAT3 nous a permis de constater qu'il est plus présent au niveau des protrusions des cellules non-métastatiques SMMC7721 que dans les cellules métastatiques HCCLM3 et MHCC97H. Ce résultat n'est pas surprenant, puisque nous avons démontré que l'ARNm STAT3 est fortement exprimé dans ces cellule, ce qui augmente la probabilité de le voir se localiser à la protrusion.

En résumé, en nous basant sur les résultats obtenus par les trois méthodes d'évaluation, nous concluons qu'il n'y pas d'enrichissement de l'ARNm STAT3 au niveau des protrusions des cellules CHC associées à un phénotype métastatique.

**A**

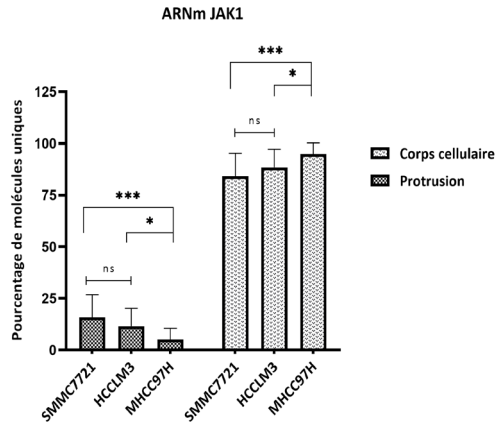


**B**

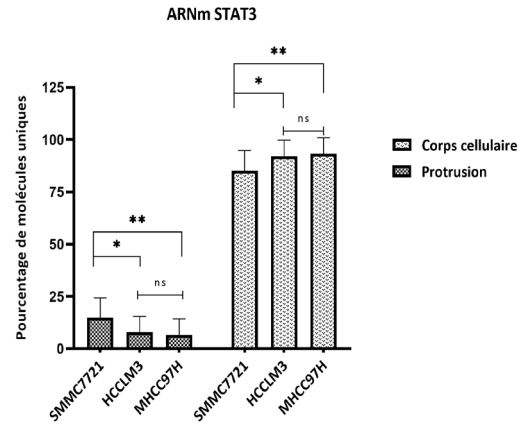


**Figure 11. Localisation des ARNm STAT3 et JAK1 aux protrusions des lignées CHC.** (A) et (B) Images qui représentent les ARNm STAT3 et JAK1 localisés dans les protrusions des cellules SMMC7721, HCCLM3 et MHCC97H qui ont été soumises à l'essai de déplétion de sérum. Le carré jaune indique l'endroit où le zoom sur la protrusion a été fait. Barre d'échelle : 5µm. Le bleu représente le marquage du noyau au DAPI. Le rouge représente le marquage Cy3 des ARNm STAT3 et JAK1 par smiFISH. Le vert représente le marquage GFP de l' $\alpha$ -actinine. Barre d'échelle: 10µm.

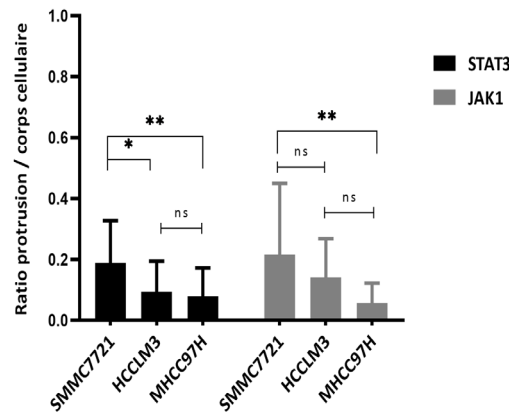
A



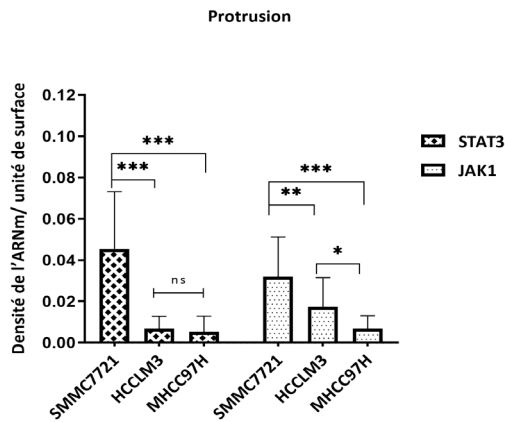
B



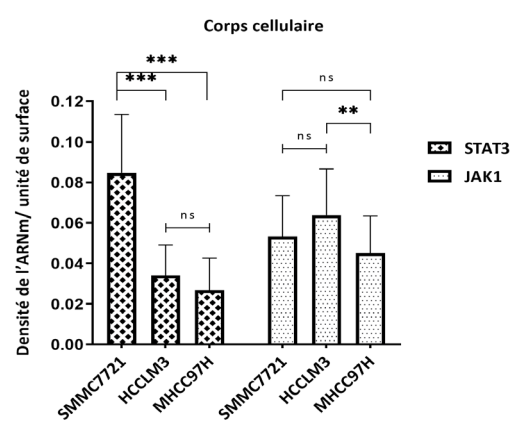
C



D



E



**Figure 12. Évaluation de l'enrichissement de l'ARNm STAT3 aux protrusions des cellules CHC associées à un phénotype métastatique.** (A) et (B) Pourcentage de molécules d'ARNm STAT3 et JAK1 localisées dans les protrusions et dans les corps cellulaires (n= 25 cellules) (C) Ratio du nombre de molécules uniques localisées dans la protrusion sur le nombre de molécules uniques localisées dans le corps cellulaire (n= 25 cellules) (D) et (E) Densité des molécules d'ARNm STAT3 et JAK1 uniques calculées par unité de surface (n= 25 cellules). Les données des trois lignées ont été comparées entre elles en appliquant le test One way ANOVA, suivi du test de Tukey (ns : non-significatif ;  $P \geq 0.05$  ; \* :  $P < 0.05$  ; \*\* :  $P < 0.01$  ; \*\*\* :  $P < 0.001$ ).

## Discussion

Le carcinome hépatocellulaire est l'un des cancers les plus agressifs et les plus meurtriers. Son incidence augmente d'année en année. Il est souvent diagnostiqué à un stade métastatique et son pronostic demeure encore très mauvais (Ogunwobi et al., 2019).

Fondamentale aux processus physiologiques, la migration cellulaire est aussi impliquée dans le développement des métastases (Tahtamouni, Ahram, Koblinski, & Rolfo, 2019). Pour migrer, les cellules adoptent une morphologie polarisée qui se caractérise, entre autres, par une accumulation de certains ARNm au front de migration, dont l'ARNm qui encode pour la  $\beta$ -actine (Turner-Bridger et al., 2018). La localisation et la traduction de cet ARNm au niveau du lamellipode assurent le maintien de la migration grâce à un assemblage rapide et efficace de la protéine  $\beta$ -actine en filaments (Katz et al., 2012). Dans les cellules saines, les mécanismes de localisation de l'ARNm sont assez bien définis, mais dans les cellules cancéreuses, il y a peu d'informations sur leur contribution dans la progression tumorale. Depuis l'introduction de la technique de la chambre modifiée de Boyden, qui permet de séparer les protrusions des corps cellulaires, l'enrichissement des ARNm aux protrusions de cellules cancéreuses métastatiques a été démontré par séquençage direct de l'ARN à haut débit (Jakobsen et al., 2013; Liu et al., 2016; Mili, Moissoglu, & Macara, 2008b). L'ARNm qui encode pour le facteur de transcription STAT3 est l'un des ARNm enrichis aux protrusions des cellules métastatiques du carcinome hépatocellulaire. Cette étude a pour objectif principal de valider l'enrichissement du transcrit STAT3 au niveau des protrusions de cellules CHC associées à un phénotype métastatique par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur molécules uniques d'ARNm. Elle s'inscrit dans le cadre d'une meilleure compréhension du mécanisme de localisation de l'ARNm qui pourrait réguler la migration cellulaire par le biais d'une synthèse locale du facteur de transcription STAT3.

Les résultats obtenus démontrent que l'approche technique utilisée pour générer et localiser les protrusions dans les cellules du carcinome hépatocellulaire est pertinente. À travers les expériences réalisées, nous avons pu voir que lors de la migration des cellules CHC, l' $\alpha$ -actinine-GFP localise et s'accumule spécifiquement au niveau du lamellipode (figures 7 et 8),

tel qu'énoncé dans la littérature (Choi et al., 2008; Senger et al., 2019). Ceci nous amène à conclure que l' $\alpha$ -actinine-GFP est un marqueur protéique approprié puisque son expression dans les cellules CHC permet de délimiter leurs régions protrusives et de les distinguer des corps cellulaires. À titre de marqueurs protéiques alternatifs, nous aurions pu utiliser la vinculine (Bays & DeMali, 2017), la paxilline (Hu et al., 2014), qui sont deux protéines d'adhésion, ou encore la cofiline (Breitsprecher et al., 2011). Cette dernière localise à la base du lamellipode et régule la dépolymérisation des filaments d'actine afin de reconstituer le réservoir de l'actine monomérique (Wioland, Jegou, & Romet-Lemonne, 2019).

En parallèle, nous avons démontré que le test d'adhérence à la fibronectine, l'essai de déplétion de sérum et l'essai de cicatrisation permettent tous d'induire la migration des cellules CHC exprimant l' $\alpha$ -actinine-GFP et de former des protrusions. L'essai de déplétion de sérum qui est celui qui génère le plus grand nombre de cellules CHC protrusives (figure 7). En fait, en absence de sérum, l'activité basale des cellules diminue; celles-ci entrent dans une phase quiescente  $G_0/G_1$ , et leur population devient homogène. Dès qu'elles sont à nouveau en présence de sérum, les cellules déclenchent simultanément une réponse aux chimioattractants (Khan et al., 2017; Pirkmajer & Chibalin, 2011). C'est cette étape de synchronisation qui permet de voir un plus grand nombre de cellules en migration. Il est intéressant de mentionner que la migration chimiotactique se produit aussi *in vivo* et que les cellules métastatiques optent pour ce moyen pour envahir et former des métastases, et ce, en raison de fortes concentrations en facteurs de croissance et en cytokines présents dans le microenvironnement tumoral (Clark & Vignjevic, 2015; Fujimori, Nakajima, Shimada, & Sawai, 2019).

Il faut rappeler que, *in vivo*, les cellules cancéreuses métastatiques infiltrent et migrent à travers une matrice extracellulaire tridimensionnelle complexe (Yamada et al., 2019). Dans l'essai de déplétion de sérum, même si cet environnement physiologique n'est pas reproduit, il est tout de même possible d'observer que les cellules CHC migrent et forment des protrusions de type lamellipode (Duval et al., 2017; Petrie & Yamada, 2012). La migration qui se fait par le biais du lamellipode est l'une des stratégies utilisées *in vivo* et dans des modèles *in vitro* 3D

(Friedl & Wolf, 2010; Lämmermann & Sixt, 2009). Les essais de migration 2D, comme l'essai de déplétion de sérum, continuent à être utilisés, car ils sont peu coûteux, pratiques et fournissent des conditions expérimentales beaucoup plus reproductibles (De Ieso & Pei, 2018). De plus, ils permettent d'étudier directement la migration cellulaire par des techniques d'imagerie avancées, telles que le *smiFISH*. Mais de telles applications ne peuvent être utilisées dans les modèles de gels qui imitent le réseau 3D de la matrice extracellulaire et qui reproduisent à juste titre la migration cellulaire *in vivo*.

Par la suite, nous avons démontré que dans l'essai de déplétion de sérum, les protrusions formées par les cellules métastatiques HCCLM3 et MHCC97H sont de taille similaire à celles formées par les cellules non-métastatiques SMMC7721. Cela s'explique probablement par le fait que les deux catégories de cellules CHC forment des protrusions de même type, soit le lamellipode. D'ailleurs, des études confirment que sur les surfaces bidimensionnelles, la migration est uniquement basée sur la formation de lamellipodes (Duval et al., 2017). Cependant, des études plus récentes ont démontré qu'une cellule cancéreuse qui migre dans une matrice 3D peut commuter entre plusieurs types de protrusions (Friedl & Wolf, 2010; Lämmermann & Sixt, 2009). Or, cette plasticité de migration n'est pas reproductible dans un essai en 2D. Il est donc nécessaire de développer des méthodes permettant de faire face à ces défis techniques, soit d'étudier ce processus fondamental avec des essais qui répliquent l'environnement physiologique.

En outre, en utilisant des sondes *smiFISH* spécifiques, nous avons démontré que l'expression des transcrits STAT3 et JAK1 est beaucoup moins importante dans les cellules métastatiques HCCLM3 et MHCC97H que dans les cellules non-métastatiques SMMC7721. D'ailleurs, nos mesures de l'expression relative de l'ARNm STAT3 par RT-qPCR dans les différentes lignées CHC WT concordent avec les mesures obtenues par quantification du *smiFISH*. Les deux méthodes nous ont permis de constater que les niveaux d'expression de l'ARNm STAT3 sont trois à quatre fois moins importants dans les cellules HCCLM3 et MHCC97H que dans les cellules SMMC7721. Dans leur étude, nos collaborateurs de Chine n'ont pas comparé les



niveaux d'expression des transcrits identifiés comme étant enrichis entre les différentes lignées CHC.

Plus encore, nous avons trouvé que l'ARNm STAT3 est exprimé à des niveaux beaucoup plus réduits que l'ARNm JAK1 (Figure 9). Ce résultat est surprenant et inattendu parce que dans un grand nombre de tumeurs malignes, la protéine STAT3 est surexprimée (Cocchiola et al., 2019). À ce sujet, des études suggèrent que c'est l'activation constitutive de STAT3 sous sa forme phosphorylée (p-STAT3) qui joue un rôle dans l'invasion et le développement de métastases (S. S. Chung, Aroh, & Vadgama, 2013). Dans le carcinome hépatocellulaire notamment, la surexpression de p-STAT3 est assimilée à un pronostic défavorable pour les patients (C. Liang, Xu, Ge, Li, & Wu, 2018). À partir de ces observations, il est possible de supposer qu'il existe un lien entre le taux peu élevé de l'ARNm STAT3 exprimé dans les cellules métastatiques HCCLM3 et MHCC97H et l'activation constitutive de la protéine STAT3. Mais cette hypothèse demeure à explorer. Aussi, nous ne comprenons pas exactement pourquoi les cellules CHC non-métastatiques SMMC7721, à la différence de celles qui sont métastatiques, ne perdent pas l'expression de l'ARNm STAT3. Cela nous amène à supposer que dans le carcinome hépatocellulaire, STAT3 aurait une fonction dans le développement de ce cancer, mais à un stade spécifique où l'expression de son ARNm serait affectée, voire diminuée (Jiang et al., 2017); ou encore l'expression de l'ARNm STAT3 pourrait corrélérer avec l'expression d'autres gènes. D'ailleurs, dans une étude, Masuda, Akinori, et *al.*, ont démontré que l'expression de l'ARNm STAT3 corrèle avec celle de l'ARNm p53, et les deux transcrits sont réprimés dans les cellules du carcinome rénal. Toutefois, dans les cellules rénales non tumorales, ils ont démontré qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'expression de de ces deux ARNm. Selon ces chercheurs, des événements de mutation auraient pu affecter la transcription de STAT3 dans les cellules du carcinome rénal (Masuda, Kamai, Abe, Arai, & Yoshida, 2009).

Finalement, contrairement à ce que nos collaborateurs ont démontré par séquençage direct de l'ARN à haut débit, notre étude réalisée par *smiFISH* ne montre pas d'enrichissement de l'ARNm STAT3 au niveau des protrusions des cellules CHC associées à un phénotype

métastatique. Nous avons démontré que dans les trois lignées CHC étudiées, les molécules d'ARNm STAT3 uniques localisent majoritairement au niveau des corps cellulaires et très peu au niveau des protrusions. Nous avons également démontré que le ratio du nombre de molécules d'ARNm STAT3 uniques localisées dans les protrusions sur le nombre de molécules uniques localisées dans les corps cellulaires est nettement plus petit pour les cellules métastatiques que pour les cellules non-métastatiques, ce qui indique qu'il n'y a pas d'enrichissement. D'ailleurs, il n'est pas surprenant d'observer qu'un plus grand nombre de molécules uniques de l'ARNm STAT3 localisent au niveau des protrusions des cellules non-métastatiques SMMC7721 qu'aux protrusions des cellules métastatiques, puisque nous avons démontré que les cellules SMMC7721 expriment fortement ce transcrit. Finalement, nous avons démontré que la densité de l'ARNm STAT3 / unité de surface dans les protrusions des cellules HCCLM3 et MHCC97H est nettement inférieure à celle des cellules non-métastatiques SMMC7721, ce qui confirme encore une fois qu'il n'y a pas d'enrichissement.

**L'enrichissement de l'ARNm STAT3 aux protrusions des cellules CHC métastatiques démontré par séquençage direct de l'ARN à haut débit n'a pas été confirmé par l'approche *smiFISH***

La non-validation par *smiFISH* des résultats obtenus par séquençage direct de l'ARN peut être attribuée, entre autres, aux variabilités techniques et biologiques existant entre les deux approches.

Dans l'essai de déplétion de sérum, réalisé sur une surface bidimensionnelle, les lignées cellulaires CHC forment des protrusions de type lamellipode. Dans la chambre modifiée de Boyden, comme les cellules étendent des protrusions qui infiltrent des pores de 1µm, elles doivent être de taille et de type différents du lamellipode. Aussi, comme les cellules métastatiques HCCLM3 sont plus invasives que les cellules non-métastatiques SMMC7721, nous pouvons supposer qu'elles ont pu infiltrer les pores de la membrane en plus grand nombre et de manière beaucoup plus efficace que les SMMC7721. En nous basant sur leur fort potentiel invasif, nous pouvons supposer aussi que le nombre, la taille et le type de protrusions qui ont été isolées des cellules HCCLM3 par nos collaborateurs étaient probablement

différents de ceux des cellules SMMC7721. D'ailleurs, des études ont démontré que le nombre, la taille et le type de protrusions isolés avec la chambre modifiée de Boyden ont un effet sur les profils de localisation des ARNm détectés.

Pour identifier les ARNm enrichis aux protrusions des cellules MDA-MB-231, Zhang, Pengchao, et *al.*, ont réalisé un séquençage de l'ARN sur des quantités égales d'ARN extrait à partir de 600 et de 20 protrusions ainsi que de leurs corps cellulaires respectifs. En utilisant 600 protrusions, ils ont détecté plus de 8000 gènes enrichis, mais en utilisant 20 protrusions, ils ont détecté moins de 4000 gènes enrichis (Zhang et al., 2019). Le nombre de protrusions utilisé comme matériel de départ pour l'ARN-Seq semble avoir un effet sur les profils de localisation des ARNm détectés. Compte tenu de ce qui précède, nous pouvons supposer qu'au départ, nos collaborateurs ont utilisé un nombre de protrusions issues des cellules HCCLM3 plus grand que celui des cellules SMMC7721, ce qui a possiblement pu les amener à surestimer l'abondance de l'ARNm STAT3 réellement localisé. Par contre, en ce qui nous concerne, en utilisant l'approche de *smiFISH*, nous avons analysé le même nombre de protrusions pour chaque lignée CHC, ce qui rend nos quantifications comparables.

L'étude de Wang, Hamilla *et al.*, appuie cette hypothèse, car ces chercheurs ont déterminé que les profils d'enrichissement des deux catégories d'ARN (localisation APC-dépendante vs localisation APC-indépendante) changent selon le type de protrusions. Ils ont étalé des fibroblastes sur une membrane ayant des pores de 0,4  $\mu\text{m}$  et ont constaté qu'ils formaient des protrusions de type filipode qui n'atteignent pas la surface du compartiment inférieur de la chambre de Boyden. L'analyse de ces protrusions par séquençage de l'ARN a montré que ce sont les ARNs dont la localisation ne dépend pas de la protéine APC qui sont enrichis; alors que ceux dont la localisation dépend de la protéine APC ne le sont pas. Mais lorsqu'ils ont étalé les fibroblastes sur une membrane ayant des pores plus grands (3  $\mu\text{m}$ ), ils ont constaté qu'ils formaient des protrusions de plus grande taille et que ce sont, cette fois-ci, les ARN dont la localisation dépend de la voie APC qui sont enrichis. Les chercheurs ont déduit que les ARN peuvent être enrichis de manière préférentielle. En se basant sur cette étude, nous pouvons dire que le profil de localisation de l'ARNm STAT3 que nous avons mis en évidence par *smiFISH* est différent de celui de nos collaborateurs parce que nous avons généré des

protrusions de type lamellipode, alors qu'eux ont probablement généré un autre type de protrusions.

On peut aussi affirmer que pour quantifier les profils de distribution des ARNm, l'approche *smiFISH* est plus précise que le séquençage direct de l'ARN à haut débit. Le séquençage est une approche globale qui permet d'évaluer l'expression moyenne des ARN et d'estimer la localisation de manière relative, tandis que le *smiFISH* donne des quantifications absolues de la localisation (Carlevaro-Fita & Johnson, 2019). Plus particulièrement, le séquençage direct de l'ARN (DRS) est une technique qui produit relativement peu de *reads* (moins d'un million de *reads* / cycle), ce qui limite la profondeur de séquençage et affecte la quantification des gènes faiblement exprimés (Garalde et al., 2018). Aussi, le DRS génère des *reads* ayant des taux d'erreurs élevés que peu d'outils bio-informatiques sont conçus les analyser (Kukurba & Montgomery, 2015; Ozsolak & Milos, 2011). Tous ces inconvénients ont probablement affecté l'exactitude des quantifications réalisées par nos collaborateurs et pourraient représenter une explication à la non-validation de l'enrichissement de l'ARNm STAT3 par le *smiFISH*.

Cette étude par *smiFISH* n'a pas permis de déterminer que le mécanisme de localisation de l'ARNm a un rôle dans la régulation des processus de migration et de l'invasion cellulaires du carcinome hépatocellulaire. La limite de cette étude a été de ne pas avoir étudié la migration cellulaire à l'aide d'un essai 3D, plus représentatif de l'environnement physiologique. Alternativement, nous aurions pu induire la migration des cellules CHC dans une chambre modifiée de Boyden jusqu'à ce qu'elles atteignent le compartiment inférieur, les fixer, marquer l'ARNm STAT3 par *smiFISH*, puis visualiser sa localisation. Une autre alternative aurait été de marquer l'ARNm STAT3 avec le système MS2-GFP et, par imagerie des cellules vivantes, visualiser sa localisation en 3D durant la transmigration des cellules CHC à travers la membrane poreuse. Mais cela aurait nécessité des outils optiques de sectionnement et des logiciels d'analyse appropriés (Avogaro et al., 2018; T. Wang et al., 2017).

Enfin, nous avons démontré que le profil de localisation de l'ARNm STAT3 au niveau des protrusions des cellules métastatiques est semblable à celui de JAK1 dont l'ARNm est listé

comme étant non enrichi dans les données d'ARN-Seq de nos collaborateurs de Chine. Il est fort probable que l'enrichissement de l'ARNm STAT3 n'a pas pu être validé puisqu'à la base, il est exprimé très faiblement par les cellules CHC métastatiques. Néanmoins, cela n'exclut pas l'idée que le mécanisme de localisation ne peut être mis en évidence pour d'autres ARNm. Dans les résultats d'ARN-seq, d'autres ARNm ont été catégorisés comme étant enrichis aux protrusions des cellules CHC métastatiques. Si l'on étudie la localisation de ces autres ARNm par *smiFISH*, il est possible que l'on arrive à une conclusion différente.

## **Conclusion**

En conclusion, bien que le *smiFISH* n'a pas permis de valider l'enrichissement de l'ARNm STAT3 au niveau des protrusions des cellules métastatiques du carcinome hépatocellulaire, c'est toutefois une approche directe et très appropriée à la quantification et à la visualisation des profils de distribution des ARNm. Cette technique demeure pertinente dans l'étude du mécanisme de localisation d'autres ARNm avec d'autres lignées cellulaires provenant d'autres types de cancers métastatiques.

## Bibliographie

- Avogaro, L., Querido, E., Dalachi, M., Jantsch, M. F., Chartrand, P., & Cusanelli, E. (2018). Live-cell imaging reveals the dynamics and function of single-telomere TERRA molecules in cancer cells. *RNA biology*, 15(6), 787-796.
- Bays, J. L., & DeMali, K. A. (2017). Vinculin in cell–cell and cell–matrix adhesions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(16), 2999-3009.
- Blower, M. D. (2013). Molecular insights into intracellular RNA localization *International review of cell and molecular biology* (Vol. 302, pp. 1-39): Elsevier.
- Bollrath, J., & Greten, F. R. (2009). IKK/NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO reports*, 10(12), 1314-1319.
- Breitsprecher, D., Koestler, S. A., Chizhov, I., Nemethova, M., Mueller, J., Goode, B. L., . . . Faix, J. (2011). Cofilin cooperates with fascin to disassemble filopodial actin filaments. *J Cell Sci*, 124(19), 3305-3318.
- Bryce, N. S., Clark, E. S., Ja'Mes, L. L., Currie, J. D., Webb, D. J., & Weaver, A. M. (2005). Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Current biology*, 15(14), 1276-1285.
- Bullock, S. L., Ringel, I., Ish-Horowicz, D., & Lukavsky, P. J. (2010). A'-form RNA helices are required for cytoplasmic mRNA transport in Drosophila. *Nature structural & molecular biology*, 17(6), 703.
- Buxbaum, A. R., Haimovich, G., & Singer, R. H. (2015). In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(2), 95.
- Carlevaro-Fita, J., & Johnson, R. (2019). Global positioning system: understanding long noncoding RNAs through subcellular localization. *Molecular cell*, 73(5), 869-883.
- Chao, J. A., Patskovsky, Y., Patel, V., Levy, M., Almo, S. C., & Singer, R. H. (2010). ZBP1 recognition of  $\beta$ -actin zipcode induces RNA looping. *Genes & development*, 24(2), 148-158.
- Chartrand, P., Meng, X., Singer, R. H., & Long, R. (1999). Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Current biology*, 9(6), 333-338.

- Chin, A., & Lecuyer, E. (2017). RNA localization: Making its way to the center stage. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1861(11 Pt B), 2956-2970. doi:10.1016/j.bbagen.2017.06.011
- Choi, C. K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L. A., Mogilner, A., & Horwitz, A. R. (2008). Actin and  $\alpha$ -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nature cell biology*, 10(9), 1039.
- Chung, S., & Takizawa, P. A. (2010). Multiple Myo4 motors enhance ASH1 mRNA transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*, 189(4), 755-767.
- Chung, S. S., Aroh, C., & Vadgama, J. V. (2013). Constitutive activation of STAT3 signaling regulates hTERT and promotes stem cell-like traits in human breast cancer cells. *PloS one*, 8(12), e83971.
- Clark, A. G., & Vignjevic, D. M. (2015). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current opinion in cell biology*, 36, 13-22.
- Cocchiola, R., Rubini, E., Altieri, F., Chichiarelli, S., Paglia, G., Romaniello, D., . . . Macone, A. (2019). STAT3 Post-Translational Modifications Drive Cellular Signaling Pathways in Prostate Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1815.
- Cody, N. A., Iampietro, C., & Lécuyer, E. (2013). The many functions of mRNA localization during normal development and disease: from pillar to post. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2(6), 781-796.
- Cramer, L. P. (2013). Mechanism of cell rear retraction in migrating cells. *Current opinion in cell biology*, 25(5), 591-599.
- Cuvelier, D., Théry, M., Chu, Y.-S., Dufour, S., Thiéry, J.-P., Bornens, M., . . . Mahadevan, L. (2007). The universal dynamics of cell spreading. *Current biology*, 17(8), 694-699.
- De Ieso, M. L., & Pei, J. V. (2018). An accurate and cost-effective alternative method for measuring cell migration with the circular wound closure assay. *Bioscience reports*, 38(5), BSR20180698.
- De Pascalis, C., & Etienne-Manneville, S. (2017). Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Molecular biology of the cell*, 28(14), 1833-1846.
- Delanoue, R., Herpers, B., Soetaert, J., Davis, I., & Rabouille, C. (2007). Drosophila Squid/hnRNP helps Dynein switch from a gurken mRNA transport motor to an ultrastructural static anchor in sponge bodies. *Developmental cell*, 13(4), 523-538.
- Deshler, J. O., Highett, M. I., Abramson, T., & Schnapp, B. J. (1998). A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Current biology*, 8(9), 489-496.



- Dienstbier, M., Boehl, F., Li, X., & Bullock, S. L. (2009). Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. *Genes & development*, 23(13), 1546-1558.
- Disanza, A., Bisi, S., Winterhoff, M., Milanesi, F., Ushakov, D. S., Kast, D., . . . Nickel, W. (2013). CDC42 switches IRSp53 from inhibition of actin growth to elongation by clustering of VASP. *The EMBO journal*, 32(20), 2735-2750.
- Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*, 32(4), 266-277.
- Edwards, M., Zwolak, A., Schafer, D. A., Sept, D., Dominguez, R., & Cooper, J. A. (2014). Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(10), 677.
- Faix, J., & Rottner, K. (2006). The making of filopodia. *Current opinion in cell biology*, 18(1), 18-25.
- Fricke, I. B., De Souza, R., Ayub, L. C., Francia, G., Kerbel, R., Jaffray, D. A., & Zheng, J. (2018). Spatiotemporal assessment of spontaneous metastasis formation using multimodal in vivo imaging in HER2+ and triple negative metastatic breast cancer xenograft models in mice. *PloS one*, 13(5), e0196892.
- Friedl, P., & Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of cell biology*, 188(1), 11-19.
- Fujimori, T., Nakajima, A., Shimada, N., & Sawai, S. (2019). Tissue self-organization based on collective cell migration by contact activation of locomotion and chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(10), 4291-4296.
- Fukumoto, M., Kurisu, S., Yamada, T., & Takenawa, T. (2015).  $\alpha$ -Actinin-4 enhances colorectal cancer cell invasion by suppressing focal adhesion maturation. *PloS one*, 10(4), e0120616.
- Gagnon, J. A., & Mowry, K. L. (2011). Molecular motors: directing traffic during RNA localization. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 46(3), 229-239. doi:10.3109/10409238.2011.572861
- Garalde, D. R., Snell, E. A., Jachimowicz, D., Sipos, B., Lloyd, J. H., Bruce, M., . . . Warland, A. (2018). Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nature methods*, 15(3), 201.
- Glock, C., Heumuller, M., & Schuman, E. M. (2017). mRNA transport & local translation in neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 45, 169-177. doi:10.1016/j.conb.2017.05.005
- Goure, J.-P. (2011). *L'optique dans les instruments: Généralités*: Lavoisier.

- Heasman, J., Wessely, O., Llangland, R., Craig, E. J., & Kessler, D. S. (2001). Vegetal localization of maternal mRNAs is disrupted by VegT depletion. *Developmental biology*, 240(2), 377-386.
- Heym, R. G., & Niessing, D. (2012). Principles of mRNA transport in yeast. *Cellular and molecular life sciences*, 69(11), 1843-1853.
- Hochberg-Laufer, H., Schwed-Gross, A., Neugebauer, K. M., & Shav-Tal, Y. (2019). Uncoupling of nucleo-cytoplasmic RNA export and localization during stress. *Nucleic acids research*, 47(9), 4778-4797.
- Hu, Y.-L., Lu, S., Szeto, K. W., Sun, J., Wang, Y., Lasheras, J. C., & Chien, S. (2014). FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Scientific reports*, 4, 6024.
- Huang, B., Bates, M., & Zhuang, X. (2009). Super-resolution fluorescence microscopy. *Annual review of biochemistry*, 78, 993-1016.
- Huttenlocher, A., & Horwitz, A. R. (2011). Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(9), a005074.
- Jacquemet, G., Hamidi, H., & Ivaska, J. (2015). Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Current opinion in cell biology*, 36, 23-31.
- Jakobsen, K. R., Sørensen, E., Brøndum, K. K., Daugaard, T. F., Thomsen, R., & Nielsen, A. L. (2013). Direct RNA sequencing mediated identification of mRNA localized in protrusions of human MDA-MB-231 metastatic breast cancer cells. *Journal of molecular signaling*, 8(1), 9.
- Jambor, H., Mueller, S., Bullock, S. L., & Ephrussi, A. (2014). A stem-loop structure directs oskar mRNA to microtubule minus ends. *RNA*, 20(4), 429-439. doi:10.1261/rna.041566.113
- Jiang, G., Huang, C., Li, J., Huang, H., Jin, H., Zhu, J., . . . Huang, C. (2017). Role of STAT3 and FOXO1 in the divergent therapeutic responses of non-metastatic and metastatic bladder cancer cells to miR-145. *Molecular cancer therapeutics*, 16(5), 924-935.
- Kamran, M. Z., Patil, P., & Gude, R. P. (2013). Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *BioMed research international*, 2013.
- Kaptein, A., Paillard, V., & Saunders, M. (1996). Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 271(11), 5961-5964.

- Katz, Z. B., Wells, A. L., Park, H. Y., Wu, B., Shenoy, S. M., & Singer, R. H. (2012).  $\beta$ -Actin mRNA compartmentalization enhances focal adhesion stability and directs cell migration. *Genes & development*, 26(17), 1885-1890.
- Khan, M. H., Salomaa, S. I., Jacquemet, G., Butt, U., Miihkinen, M., Deguchi, T., . . . Pouwels, J. (2017). The Sharpin interactome reveals a role for Sharpin in lamellipodium formation via the Arp2/3 complex. *J Cell Sci*, 130(18), 3094-3107.
- Kirfel, G., Rigort, A., Borm, B., & Herzog, V. (2004). Cell migration: mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks. *European journal of cell biology*, 83(11-12), 717-724.
- Kislauskis, E. H., Zhu, X., & Singer, R. H. (1994). Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *The Journal of cell biology*, 127(2), 441-451.
- Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A., & Hell, S. W. (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), 8206-8210.
- Kloc, M., Wilk, K., Vargas, D., Shirato, Y., Bilinski, S., & Etkin, L. D. (2005). Potential structural role of non-coding and coding RNAs in the organization of the cytoskeleton at the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development*, 132(15), 3445-3457.
- Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., & Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 752(1), 10-24.
- Krause, M., & Gautreau, A. (2014). Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(9), 577.
- Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA sequencing and analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(11), pdb. top084970.
- Lämmermann, T., & Sixt, M. (2009). Mechanical modes of ‘amoeboid’ cell migration. *Current opinion in cell biology*, 21(5), 636-644.
- Lasko, P. (2012). mRNA localization and translational control in *Drosophila* oogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(10). doi:10.1101/cshperspect.a012294
- Lassmann, S., Schuster, I., Walch, A., Göbel, H., Jütting, U., Makowiec, F., . . . Werner, M. (2007). STAT3 mRNA and protein expression in colorectal cancer: effects on STAT3-inducible targets linked to cell survival and proliferation. *Journal of clinical pathology*, 60(2), 173-179.

- Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84(3), 359-369.
- Le Clainche, C., & Carlier, M.-F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological reviews*, 88(2), 489-513.
- Lécuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., . . . Krause, H. M. (2007). Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell*, 131(1), 174-187.
- Lefebvre, F. A., Cody, N. A., Bouvrette, L. P. B., Bergalet, J., Wang, X., & Lécuyer, E. (2017). CeFra-seq: systematic mapping of RNA subcellular distribution properties through cell fractionation coupled to deep-sequencing. *Methods*, 126, 138-148.
- Li, G., & Neuert, G. (2019). Multiplex RNA single molecule FISH of inducible mRNAs in single yeast cells. *Scientific data*, 6(1), 94.
- Liang, C., Xu, Y., Ge, H., Li, G., & Wu, J. (2018). Clinicopathological significance and prognostic role of p-sTaT3 in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncotargets and therapy*, 11, 1203.
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, 2(2), 329.
- Lin, A. C., & Holt, C. E. (2007). Local translation and directional steering in axons. *The EMBO journal*, 26(16), 3729-3736.
- Liu, Y.-h., Jin, J.-l., Wang, Y.-z., Tan, Y., Zhou, Y.-y., Peng, T., . . . Jiang, Y.-y. (2016). Protrusion-localized STAT3 mRNA promotes metastasis of highly metastatic hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(6), 805.
- Long, R. M., Singer, R. H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., & Jansen, R.-P. (1997). Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science*, 277(5324), 383-387.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLoS computational biology*, 13(5), e1005457.
- Macdonald, P. M., & Struhl, G. (1988). Cis-acting sequences responsible for anterior localization of bicoid mRNA in Drosophila embryos. *Nature*, 336(6199), 595.
- Maizels, Y., Oberman, F., Miloslavski, R., Ginzach, N., Berman, M., & Yisraeli, J. K. (2015). Localization of cofilin mRNA to the leading edge of migrating cells promotes directed cell migration. *J Cell Sci*, 128(10), 1922-1933.
- Marchand, V., Gaspar, I., & Ephrussi, A. (2012). An intracellular transmission control protocol: assembly and transport of ribonucleoprotein complexes. *Current opinion in cell biology*, 24(2), 202-210.

- Mardakheh, F. K., Paul, A., Kümper, S., Sadok, A., Paterson, H., McCarthy, A., . . . Marshall, C. J. (2015). Global analysis of mRNA, translation, and protein localization: local translation is a key regulator of cell protrusions. *Developmental cell*, 35(3), 344-357.
- Martin, K. C., & Ephrussi, A. (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell*, 136(4), 719-730.
- Masuda, A., Kamai, T., Abe, H., Arai, K., & Yoshida, K.-I. (2009). Is Stat3 and/or p53 mRNA expression a prognostic marker for renal cell carcinoma? *Biomedical Research*, 30(3), 171-176.
- Mattila, P. K., & Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(6), 446.
- Medioni, C., Mowry, K., & Besse, F. (2012). Principles and roles of mRNA localization in animal development. *Development*, 139(18), 3263-3276.
- Mili, S., Moissoglu, K., & Macara, I. G. (2008a). Genome-Wide Screen Identifies Localized RNAs Anchored At Cell Protrusions Through Microtubules And APC. *Nature*, 453(7191), 115.
- Mili, S., Moissoglu, K., & Macara, I. G. (2008b). Genome-wide screen reveals APC-associated RNAs enriched in cell protrusions. *Nature*, 453(7191), 115.
- Mingle, L. A., Okuhama, N. N., Shi, J., Singer, R. H., Condeelis, J., & Liu, G. (2005). Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *Journal of Cell Science*, 118(11), 2425-2433.
- Moffitt, J. R., & Zhuang, X. (2016). RNA imaging with multiplexed error-robust fluorescence in situ hybridization (MERFISH) *Methods in enzymology* (Vol. 572, pp. 1-49): Elsevier.
- Murphy, D. A., & Courtneidge, S. A. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(7), 413.
- Niell, N., Larriba, M. J., Ferrer-Mayorga, G., Sánchez-Pérez, I., Cantero, R., Real, F. X., . . . González-Sancho, J. M. (2018). The human PKP2/plakophilin-2 gene is induced by Wnt/ $\beta$ -catenin in normal and colon cancer-associated fibroblasts. *International journal of cancer*, 142(4), 792-804.
- Niessing, D., Hüttelmaier, S., Zenklusen, D., Singer, R. H., & Burley, S. K. (2004). She2p is a novel RNA binding protein with a basic helical hairpin motif. *Cell*, 119(4), 491-502.

- Nussbacher, J. K., Tabet, R., Yeo, G. W., & Lagier-Tourenne, C. (2019). Disruption of RNA Metabolism in Neurological Diseases and Emerging Therapeutic Interventions. *Neuron*, 102(2), 294-320.
- Ogunwobi, O. O., Harricharran, T., Huaman, J., Galuza, A., Odumuwagun, O., Tan, Y., . . . Nguyen, M. T. (2019). Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. *World journal of gastroenterology*, 25(19), 2279.
- Okuda, H. (2007). Hepatocellular carcinoma development in cirrhosis. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 21(1), 161-173.
- Ozsolak, F., & Milos, P. M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature reviews genetics*, 12(2), 87.
- Paluch, E. K., & Raz, E. (2013). The role and regulation of blebs in cell migration. *Current opinion in cell biology*, 25(5), 582-590.
- Parsons, J. T., Horwitz, A. R., & Schwartz, M. A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(9), 633.
- Petrie, R. J., & Yamada, K. M. (2012). At the leading edge of three-dimensional cell migration. *J Cell Sci*, 125(24), 5917-5926.
- Pirkmajer, S., & Chibalin, A. V. (2011). Serum starvation: caveat emptor. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 301(2), C272-C279.
- Pizzinga, M., Bates, C., Lui, J., Forte, G., Morales-Polanco, F., Linney, E., . . . Berchowitz, L. E. (2019). Translation factor mRNA granules direct protein synthetic capacity to regions of polarized growth. *J Cell Biol*, 218(5), 1564-1581.
- Putzbach, W., Gao, Q. Q., Patel, M., Van Dongen, S., Haluck-Kangas, A., Sarshad, A. A., . . . Hafner, M. (2017). Many si/shRNAs can kill cancer cells by targeting multiple survival genes through an off-target mechanism. *Elife*, 6, e29702.
- Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in cell biology*, 16(10), 522-529.
- Ridley, A. J. (2011). Life at the leading edge. *Cell*, 145(7), 1012-1022.
- Senger, F., Pitaval, A., Ennomani, H., Kurzawa, L., Blanchoin, L., & Théry, M. (2019). Spatial integration of mechanical forces by alpha-actinin establishes actin network symmetry. *bioRxiv*, 578799.
- Shankar, J., & Nabi, I. R. (2011). RNA purification from tumor cell protrusions using porous polycarbonate filters *RNA Detection and Visualization* (pp. 353-366): Springer.

- Shestakova, E. A., Singer, R. H., & Condeelis, J. (2001). The physiological significance of beta -actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13), 7045-7050. doi:10.1073/pnas.121146098
- Sladewski, T. E., Billington, N., Ali, M. Y., Bookwalter, C. S., Lu, H., Kremmentsova, E. B., . . . Trybus, K. M. (2018). Recruitment of two dyneins to an mRNA-dependent Bicaudal D transport complex. *Elife*, 7, e36306.
- Spille, J.-H., & Kubitscheck, U. (2015). Labelling and imaging of single endogenous messenger RNA particles in vivo. *J Cell Sci*, 128(20), 3695-3706.
- Svinka, J., Mikulits, W., & Eferl, R. (2014). STAT3 in hepatocellular carcinoma: new perspectives. *Hepatic oncology*, 1(1), 107-120.
- Tahtamouni, L., Ahram, M., Koblinski, J., & Rolfo, C. (2019). Molecular Regulation of Cancer Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Analytical Cellular Pathology*, 2019.
- Tegtmeyer, N., Hartig, R., Delahay, R. M., Rohde, M., Brandt, S., Conradi, J., . . . Backert, S. (2010). A small fibronectin-mimicking protein from bacteria induces cell spreading and focal adhesion formation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(30), 23515-23526.
- Teng, T. S., Lin, B., Manser, E., Ng, D. C. H., & Cao, X. (2009). Stat3 promotes directional cell migration by regulating Rac1 activity via its activator  $\beta$ PIX. *Journal of Cell Science*, 122(22), 4150-4159.
- Teng, Y., Liu, M., & Cowell, J. K. (2011). Functional interrelationship between the WASF3 and KISS1 metastasis-associated genes in breast cancer cells. *International journal of cancer*, 129(12), 2825-2835.
- Teng, Y., Ross, J. L., & Cowell, J. K. (2014). The involvement of JAK-STAT3 in cell motility, invasion, and metastasis. *Jak-stat*, 3(1), e28086.
- Tojkander, S., Gateva, G., & Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci*, 125(8), 1855-1864.
- Tsanov, N., Samacoits, A., Chouaib, R., Traboulsi, A.-M., Gostan, T., Weber, C., . . . Peter, M. (2016). smiFISH and FISH-quant—a flexible single RNA detection approach with super-resolution capability. *Nucleic acids research*, 44(22), e165-e165.
- Turner-Bridger, B., Jakobs, M., Muresan, L., Wong, H. H.-W., Franze, K., Harris, W. A., & Holt, C. E. (2018). Single-molecule analysis of endogenous  $\beta$ -actin mRNA trafficking reveals a mechanism for compartmentalized mRNA localization in axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41), E9697-E9706.

- Vicente-Manzanares, M., Choi, C. K., & Horwitz, A. R. (2009). Integrins in cell migration—the actin connection. *Journal of Cell Science*, 122(2), 199-206.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S., & Horwitz, A. R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(11), 778.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D. J., & Horwitz, A. R. (2005). Cell migration at a glance. *Journal of Cell Science*, 118(21), 4917-4919.
- Vogt, A. (2010). Advances in two-dimensional cell migration assay technologies. *Eur Pharm Rev*, 5, 26-29.
- Wang, P., Xue, Y., Han, Y., Lin, L., Wu, C., Xu, S., . . . Cao, X. (2014). The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science*, 344(6181), 310-313.
- Wang, T., Hamilla, S., Cam, M., Aranda-Espinoza, H., & Mili, S. (2017). Extracellular matrix stiffness and cell contractility control RNA localization to promote cell migration. *Nature communications*, 8(1), 896.
- Wehrle-Haller, B. (2012). Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Current opinion in cell biology*, 24(5), 569-581.
- Wioland, H., Jegou, A., & Romet-Lemonne, G. (2019). Torsional stress generated by ADF/cofilin on cross-linked actin filaments boosts their severing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(7), 2595-2602.
- Wolfenson, H., Lavelin, I., & Geiger, B. (2013). Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. *Developmental cell*, 24(5), 447-458.
- Xia, C., Babcock, H. P., Moffitt, J. R., & Zhuang, X. (2019). Multiplexed detection of RNA using MERFISH and branched DNA amplification. *Scientific reports*, 9(1), 7721.
- Xiao, L., Rao, J. N., Zou, T., Liu, L., Marasa, B. S., Chen, J., . . . Wang, J.-Y. (2007). Polyamines regulate the stability of activating transcription factor-2 mRNA through RNA-binding protein HuR in intestinal epithelial cells. *Molecular biology of the cell*, 18(11), 4579-4590.
- Xing, L., & Bassell, G. J. (2013). mRNA localization: an orchestration of assembly, traffic and synthesis. *Traffic*, 14(1), 2-14. doi:10.1111/tra.12004
- Yamada, K. M., Collins, J. W., Cruz Walma, D. A., Doyle, A. D., Morales, S. G., Lu, J., . . . Shinsato, Y. (2019). Extracellular matrix dynamics in cell migration, invasion and tissue morphogenesis. *International journal of experimental pathology*.



- Yang, J., Chatterjee-Kishore, M., Staugaitis, S. M., Nguyen, H., Schlessinger, K., Levy, D. E., & Stark, G. R. (2005). Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer research*, 65(3), 939-947.
- Yasuda, K., Zhang, H., Loiselle, D., Haystead, T., Macara, I. G., & Mili, S. (2013). The RNA-binding protein Fus directs translation of localized mRNAs in APC-RNP granules. *J Cell Biol*, 203(5), 737-746.
- Ye, N., Verma, D., Meng, F., Davidson, M. W., Suffoletto, K., & Hua, S. Z. (2014). Direct observation of  $\alpha$ -actinin tension and recruitment at focal adhesions during contact growth. *Experimental cell research*, 327(1), 57-67.
- Yu, H., & Jove, R. (2004). The STATs of cancer—new molecular targets come of age. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 97.
- Zhang, P., Han, X., Yao, J., Shao, N., Zhang, K., Zhou, Y., . . . Qin, L. (2019). High-Throughput Isolation of Cell Protrusions with Single-Cell Precision for Profiling Subcellular Gene Expression. *Angewandte Chemie International Edition*.